





دانشگاه آزاد اسلامی
واحد علوم و تحقیقات

رساله دکتری رشته دامپزشکی - کلینیکال پاتولوژی (Ph.D)

موضوع

**بررسی برخی الگوهای سیتو شیمیایی گلبولهای سفید خون گونه های
قاس ماهیان (جنوب) دریای خزر**

استادان راهنما

دکتر شهاب الدین صافی

دکتر محمود بهمنی

استاد مشاور

دکتر بهیار جلالی جعفری

نگارنده

لیلا مدیری

سال ۱۳۸۸-۱۳۸۷

باسپاسمندی فراوان از اساتید بزرگوار:

جناب آقای دکتر شهاب الدین صافی بدلیل رهنمودهای ارزنده (انشاء)

جناب آقای دکتر محمود بهمنی بدلیل همراهی سودمند (انشاء)

زننده باد جناب آقای دکتر بهار جلالی جعفری بدلیل مشاوره ارزشمند

(انشاء)

باسپاسگزاری بسیار از یاری استادان گرانمایه:

جناب آقای دکتر لرج سهرابی محفروس

جناب آقای دکتر غلامحسین خواجه

جناب آقای دکتر بابا آفری ناکامی

سرکار خانم دکتر زهره خانی

تقدیم به:

پدر بزرگوار و مادر مهربانم که
در راه تحصیل و پیشرفت
فرزندشان همواره کوشیده اند.
همسرم که صبر و حمایت او پشتیبان
من بوده است.

فرزندم که در سختی های دوره
تحصیل گرما بخش وجودم بود.

عنوان	فهرست مندرجات	صفحه
چکیده فارسی		۱
فصل اول - کلیات		۲
فصل دوم - پیشینه تحقیق		۵
۱- دریای خزر		۶
۲- ماهیان		۷
۱-۲- رده بندی ماهیان		۷
۲-۲- رده بندی ماهیان خاویاری		۸
۳- آناتومی و فیزیولوژی بافت و اندامهای خونی - لنفی		۹
۳-۱- ایمنی غیر اختصاصی		۱۰
۳-۲- ایمنی اکتسابی		۱۲
۳-۳- پاسخ ایمنی		۱۶
۳-۳-۱- ایمونوگلوبولین ها		۱۶
۳-۳-۲- تکامل پاسخ ایمنی هومورال		۱۸
۳-۳-۳- تکامل پاسخ ایمنی سلولی		۱۸
۴- لکوسیت های خون ماهیان		۲۰
۴-۱- گرانولوسیت های ماهیان غضروفی		۲۰
۴-۲- گرانولوسیت های ماهیان استخوانی		۲۱
۴-۲-۱- نوتروفیل ها		۲۱
۴-۲-۲- ائوزینوفیل ها		۲۲
۴-۲-۳- بازوفیل ها		۲۳
۴-۳- آگرانولوسیت های ماهیان		۲۳
۴-۳-۱- لنفوسیت ها		۲۳
۴-۳-۲- مونوسیت ها		۲۴
۵- روش های خون شناسی		۲۴

۲۵	۵-۱- بررسی بیولوژیک لکوسیتها
۲۷	۵-۲- بررسی سیتوشیمیایی
۲۷	۵-۲-۱- میلوپراکسیداز (PER)
۲۸	۵-۲-۲- سودان بلک بی (SBB)
۲۸	۵-۲-۳- استراز اختصاصی (CAE)
۲۹	۵-۲-۴- استراز غیر اختصاصی (α NAE)
۳۰	۵-۲-۵- فسفاتاز قلیایی (LAP)
۳۰	۵-۲-۶- اسید فسفاتاز (ACP)
۳۱	۵-۲-۷- پرئودیک اسید شیف (PAS)
۳۱	۵-۲-۸- تولوئیدن بلو
۳۱	۵-۲-۹- بتا گلوکورونیداز (β G)
۳۲	۶- یافته ها و ویژگیهای سیتوشیمیایی لکوسیتها
۳۲	۶-۱- ویژگیهای سیتوشیمیایی لکوسیتهای جانوران
۳۲	۶-۱-۱- ویژگی های سیتوشیمیایی نوتروفیل ها / هتروفیل ها
۳۳	۶-۱-۲- ویژگی های سیتوشیمیایی ائوزینوفیل ها
۳۳	۶-۱-۳- ویژگی های سیتوشیمیایی بازوفیل ها
۳۴	۶-۱-۴- ویژگی های سیتوشیمیایی مونوسیت ها
۳۴	۶-۱-۵- ویژگی های سیتوشیمیایی لنفوسیتها
۳۵	۶-۲- یافته ها و ویژگیهای سیتوشیمیایی لکوسیتهای ماهیان
۳۹	فصل سوم - مواد و روش کار
۴۰	۱- مواد و وسایل
۴۰	۲- روش کار
۴۰	۲-۱- نمونه برداری
۴۱	۲-۲- آماده سازی نمونه ها و تهیه گسترش خون
۴۱	۲-۳- روش های رنگ آمیزی
۴۰	۲-۳-۱- روش رنگ آمیزی میلو پراکسیداز
۴۲	۲-۳-۲- روش رنگ آمیزی سودان بلک بی

۴۲	۲-۳-۳- روش رنگ آمیزی نفتول AS-D کلرواستات استراز
۴۳	۲-۳-۴- روش رنگ آمیزی آلفا نفتیل استات استراز
۴۳	۲-۳-۵- روش رنگ آمیزی اسید فسفاتاز
۴۴	۲-۳-۶- روش رنگ آمیزی پریودیک اسید شیف
۴۴	۲-۳-۷- رنگ آمیزی بتا گلوکوروئیداز
۴۵	۲-۴- بررسی گسترش های رنگ آمیزی شده
۴۵	۲-۴-۱- شمارش تفریقی
۴۵	۲-۴-۲- اندازه گیری (مورفومتری)
۴۶	۲-۴-۳- عکسبرداری
۴۶	۲-۵- بررسی های آماری

فصل چهارم - نتایج

۴۸	۱- یافته های مورفولوژی و شمارش نسبی
۴۸	۱-۱- نوتروفیل
۴۹	۱-۲- ائوزینوفیل
۴۹	۱-۳- بازوفیل
۵۰	۱-۴- لنفوسیت
۵۰	۱-۵- مونوسیت
۵۱	۲- یافته های مورفومتری
۵۱	۲-۱- نوتروفیل
۵۲	۲-۲- ائوزینوفیل
۵۳	۲-۳- بازوفیل
۵۳	۲-۴- لنفوسیت
۵۵	۲-۵- مونوسیت
۵۶	۳- یافته های سیتوشیمیایی
۵۶	۳-۱- رنگ پذیری با رومانوفسکی
۵۶	۳-۲- رنگ پذیری با سودان بلک بی
۵۸	۳-۳- رنگ پذیری با پریودیک اسید شیف

۵۸	۳-۴- رنگ پذیری با اسید فسفاتاز
۵۹	۳-۵- رنگ پذیری با پراکسیداز
۵۹	۳-۶- رنگ پذیری با نفتول AS-D کلرواستات استراز
۶۰	۳-۷- رنگ پذیری با آلفا نفتیل استات استراز
۶۱	۳-۸- رنگ پذیری با بتا گلوکوروئیداز
۶۲	فصل پنجم - بحث و تفسیر نتایج
۷۸	پیشنهادهات
۷۹	فهرست منابع
۸۸	پیوست
۸۹	۱- جداول
۹۵	۲- تصاویر
۱۱۰	چکیده انگلیسی

فهرست جداول

صفحه	عنوان
۸۹	جدول شماره ۱: شمارش افتراقی گلبول های سفید خون گونه های تاس ماهیان بررسی شده با رنگ رومانوفسکی
۹۰	جدول شماره ۲: بررسی اندازه نوتروفیل های گونه های تاس ماهیان بررسی شده (میکرومتر)
۹۱	جدول شماره ۳: بررسی اندازه ائوزینوفیل های گونه های تاس ماهیان بررسی شده (میکرومتر)
۹۲	جدول شماره ۴: بررسی اندازه لنفوسیت های گونه های تاس ماهیان بررسی شده (میکرومتر)
۹۳	جدول شماره ۵: بررسی اندازه مونوسیت های گونه های تاس ماهیان بررسی شده (میکرومتر)
۹۴	جدول شماره ۶: بررسی الگوی سیتوشیمیایی گونه های تاس ماهیان بررسی شده

صفحه	عنوان
۹۵	تصویر شماره ۱: تاس ماهی ایرانی (قره برون) <i>Acipenser persicus</i>
۹۵	تصویر شماره ۲: شیپ <i>Acipenser nudiventris</i>
۹۵	تصویر شماره ۳: ازون برون <i>Acipenser stellatus</i>
۹۶	تصویر شماره ۴: تاس ماهی روسی (چالباش) <i>Acipenser geldenstaedtii</i>
۹۶	تصویر شماره ۵: فیل ماهی <i>Huso huso</i>
۹۷	تصویر شماره ۶: روش خونگیری از ورید دمی شکمی تاس ماهیان
۹۸	تصویر شماره ۷: واکنش مثبت نوتروفیل با سودان بلک بی
۹۸	تصویر شماره ۸: واکنش ضعیف ائوزینوفیل با سودان بلک بی
۹۹	تصویر شماره ۹: واکنش مثبت نوتروفیل با پراکسیداز
۹۹	تصویر شماره ۱۰: واکنش مثبت ائوزینوفیل با پراکسیداز
۱۰۰	تصویر شماره ۱۱: واکنش مثبت نوتروفیل با پریودیک اسید شیف
۱۰۰	تصویر شماره ۱۲: واکنش مثبت لنفوسیت با پریودیک اسید شیف
۱۰۱	تصویر شماره ۱۳: واکنش ضعیف ائوزینوفیل با اسید فسفاتاز
۱۰۱	تصویر شماره ۱۴: واکنش مثبت لنفوسیت با اسید فسفاتاز
۱۰۲	تصویر شماره ۱۵: واکنش متغیر ائوزینوفیل با نفتول کلرواستات استراز
۱۰۲	تصویر شماره ۱۶: واکنش مثبت لنفوسیت با نفتول کلرواستات استراز
۱۰۳	تصویر شماره ۱۷: واکنش ضعیف ائوزینوفیل با نفتیل استات استراز
۱۰۳	تصویر شماره ۱۸: واکنش ضعیف لنفوسیت با نفتیل استات استراز
۱۰۳	تصویر شماره ۱۹: واکنش ضعیف مونوسیت با نفتیل استات استراز
۱۰۴	تصویر شماره ۲۰: واکنش مثبت مونوسیت با β گلوکوروئیداز
۱۰۵	تصویر شماره ۲۱: یافته های سیتوشیمیایی گلبولهای سفید خون <i>Acipenser nudiventris</i>

- تصویر شماره ۲۲: یافته های سیتوشیمیایی گلبولهای سفید خون *Acipenser persicus* ۱۰۶
- تصویر شماره ۲۳: یافته های سیتوشیمیایی گلبولهای سفید خون *Acipenser stellatus* ۱۰۷
- تصویر شماره ۲۴: یافته های سیتوشیمیایی گلبولهای سفید خون *Acipenser gueldenstaedtii* ۱۰۸
- تصویر شماره ۲۵: یافته های سیتوشیمیایی گلبولهای سفید خون *Huso huso* ۱۰۹

چکیده فارسی

هدف از این مطالعه بررسی چگونگی رنگ پذیری گلبول های سفید خون تاس ماهیان جنوب دریای خزر با رنگ آمیزی های سیتو شیمیایی جهت شناسایی دقیق سلولها بر اساس واکنش مواد موجود در آنها بوده است. نمونه ها به روش خوشه ای و از انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، مراکز تکثیر و بازسازی ذخائر ماهیان خاویاری شهید بهشتی، شهید رجایی و شهید مرجانی پرورش و نگهداری تاس ماهیان منطقه شمال ایران انتخاب شدند از هر رده سنی با بازه یکسال از انگشت قد تا یازده سال ده عدد ماهی برگزیده و از ورید دمی شکمی با سرنگ یکبار مصرف بدون ضد انعقاد خونگیری و بلافاصله گسترش تهیه شد. گسترش ها ابتدا با متانول تثبیت و به آزمایشگاه منتقل شدند. طبق دستورالعمل شرکت سیگما - آلد ریچ رنگ آمیزی های سیتو شیمیایی انجام شد .

نوتروفیل ها با رنگ های سودان بلک بی، پرئودیک اسید شیف و پراکسیدازواکنش مثبت اما با کلرو استات استراز واکنش منفی نشان دادند. ائوزینوفیل ها با رنگ سودان بلک بی و پراکسیداز واکنش مثبت ولی با رنگ های پرئودیک اسید شیف، کلرو استات استراز، آلفا نفتیل استات استراز و اسید فسفاتاز بطور ضعیف واکنش نشان دادند. لنفوسیت ها با رنگ اسید فسفاتاز مثبت شده اما با رنگ های کلرو استات استراز و آلفا نفتیل استات استراز بطور ضعیف واکنش نشان دادند. مونوسیت ها با رنگ آمیزی بتا گلوکوروئیداز تنها در تاس ماهیان ایرانی ۵ و ۱۱ ساله، ازون برون های ۱ و ۲ ساله، تاس ماهیان روسی ۱ ساله، شیپ های ۹ ساله و فیل ماهیان ۷ ساله واکنش مثبت و با آلفا نفتیل استات استراز بطور ضعیف واکنش نشان دادند.

واژگان کلیدی: الگوی سیتوشیمیایی، گلبولهای سفید، تاس ماهیان، جنوب دریای خزر

فصل اول

کلیات

امروزه آبزیان و آبرزی پروری در دنیا و ایران از اهمیت خاصی برخوردارند. با توجه به اهمیت زیستی ماهیان خاویاری و ارزش آنها در اقتصاد بین المللی و نیازهای بهداشتی پرورش آبزیان تلاش های بسیاری در راستای حفظ ذخایر و پرورش این ماهیان در محیط های باز و بسته انجام می پذیرد. تاس ماهیان دریای خزر با ارزش ترین ماهیان خزری و خاویاری جهان می باشند. با توجه به تلاش برای پرورش، رهاسازی بچه تاس ماهیان و تولید خاویار در ایران نیاز شدیدی به انجام تحقیقات کافی برای شناسایی فاکتورهای گوناگون بیولوژیک طبیعی در این ماهیها همراه با شناسایی ویژگیهای فیزیولوژیک آنها پدید آمده است. بررسی دقیق سلولهای خونی و واکنشهای سیتوشیمیایی این سلولها در پی بردن به ماهیت حقیقی لکوسیت ها، چگونگی عملکرد و شرکت در حفظ سلامت بدن و نیز توانایی آنها در پاسخ های ایمنی ماهیان بسیار ارزشمند است. دستاوردهای اندک و نااستوار پژوهش های انجام شده و در دسترس به روز نبوده و به سختی می توانند پاسخگوی پرسش بسیاری از پژوهشگران را بوده و داده های مطمئنی به دست دهند و در روند پرورش، بهداشت و بیماری شناسی بالینی بکار برده شوند. افزایش آلاینده های دریایی سازماندهی خونی بویژه یاخته های ایمنی این ماهیان را ناهنجار تر نموده، آنگونه که با دگرگونی الگوی یاخته های خونی و پیدایش دو رگه ها بهنگام تولید بچه ماهی، روند تشخیص نابسامانی ها و نیز بیماریها را دشوار تر نموده است.

فیزیولوژی خون به ویژه مورفولوژی سلول های خونی در ماهیان دیری است که بررسی می شود. مطالعه رنگ پذیری سیتوشیمیایی نرمال و شمارش تفریقی سلول های خونی ماهیان در دهه های گذشته بطور پراکنده انجام شده اما تعداد اندکی از آنها مربوط به تاس ماهیان بوده است. در دهه های گذشته به ویژگی های مورفولوژیک فراساختاری سلولهای خونی نیز پرداخته شده است که همچنان ماهیان خاویاری و به ویژه ماهیان خاویاری دریای خزر کمتر هدف چنین پژوهش هایی بوده اند. در راستای حمایت از گونه های در معرض خطر و بقای تولید تاس ماهیان جهت افزایش توان تولید خاویار و راستای مولد سازی و گسترش تولید بچه ماهیان جهت رهاسازی یا گسترش پرورش مصنوعی آنها چنین پژوهش هایی ضرورت غیرقابل انکار یافته است. پیرو تلاش برای شناسایی، برنامه ریزی و آماده سازی روند های پرورشی مناسب جنس های *Huso* و *Acipenser*، همراه با پژوهش هایی که بر روی پرورش این ماهیان انجام می گردید،

بافت های حیاتی نیز مورد توجه بوده است که نشانه توجه به اثرات محیطی و دوره رشد و نمو بهنگام پرورش آنها می باشد. با توجه به امکان استانداردسازی پرورش ماهیان خاویاری و سودآوری و تولید پایدار خاویار که در آن فیزیولوژی، آناتومی و فیلوژنی این ماهیان به خوبی به کار گرفته می شود، شناخت یاخته های خونی بویژه لکوسیت ها در ماهیان خاویاری پرورشی، همچنین ماهیان خاویاری آزادزی و ماهیانی که خواسته یا ناخواسته دچار نابسامانی ژنتیکی شده اند یا بعنوان مولد وارد چرخه نگهداری در مراکز پرورش می گردند اهمیتی بسزا یافت و به ویژه عملکرد دستگاه خونی - لنفی در تندرستی و بازداری از بیماری ها و نیز بهبود این ماهیان ارزشی دوچندان پیدا نموده است. بررسی مورفولوژیک یا سیتوشیمیایی سلول های خونی ماهیان خاویاری جهان از جمله دریای خزر انگشت شمار بوده و توسط افراد مختلف در کشورهای گوناگون و بصورت پراکنده به انجام رسیده است. روشن است که روشها و یافته های مورفومتری و مورفولوژی انجام شده به روز و هماهنگ با شگردهای روزآمد نبوده چنانکه نمی توان نتایج آنها را براحتی پذیرفت. در بازنگری و سنجش درستی آنها نیز از آن رو که از روش های تحقیقی استاندارد و یکسان بهره نبرده اند لذا نمی توان نتایج پژوهش های گوناگون را با یکدیگر سنجید و از آنها دستاوردی بهینه فراهم آورد تا الگوهایی کاربردی شوند. از این رو بر آن شدیم تا به تعیین الگوی برخی ویژگی های سیتوشیمیایی گلبول های سفید خون در گونه های تاس ماهیان دریای خزر اقدام نموده و همبستگی میان الگوی سیتوشیمیایی گلبول های سفید خون هریک از گونه های جنس های مختلف تاس ماهیان جنوب دریای خزر را با یکدیگر بسنجیم و نیز در راستای کمک به ارایه دامنه مرجع و تعیین ویژگی های مورفولوژیک و شناسایی دقیق سلول های خونی تاس ماهیان دریای خزر تلاش نماییم.

نظر به موفقیت تلاش پژوهشگران ایرانی در پرورش ماهیان خاویاری و استحصال خاویار از آنها و دیگر پژوهشهای در دست انجام بر فیزیولوژی و بیوشیمی این ماهیان با ارزش با توجه به طرح های ملی و بین المللی پرورش ماهیان خاویاری در داخل یا خارج از دریا، چنین پژوهش هایی از ضروریات ملزوم و غیرقابل انکار خواهند بود. این تحقیق بصورت مشاهده ای و آینده نگر و مقطعی به همراه آزمونهای آزمایشگاهی با برداشت تعدادی نمونه خون از هرگونه تاس ماهیان پرورشی از جنس های *Huso* و *Acipenser* در فواصل سنی ۱-۲ سال از انگشت قد، یکسال تا آغاز سن زاد آوری (در هر گونه) برداشت شده و لام میکروسکوپی تهیه و با تکنیک های سیتوشیمیایی رنگ آمیزی گردید. گلبول های سفید با میکروسکوپ میکروآنالیز بررسی شده و الگوی اختصاصی رنگ پذیری، تعیین هویت مورفولوژیک و مورفومتری نیز انجام شده و فیلوژنی آنها در مقایسه با متدهای رایج سیتولوژی خون ارزشگذاری شد. کلیه داده ها با استفاده از نرم افزار **SPSS** آنالیز و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و نتایج به دست آمده از داده

ها با یافته هایی که باشیوه های آزمایشگاهی رایج خون شناسی فراهم آمدند و با اندازه درستی ۹۵٪ (خطای ۵٪) گزارش گردید.

فصل دوم

پیشینه تحقیق

۱- دریای خزر :

دریای خزر بازمانده دریای پهناور «تتیس» است. دنباله رشته کوه قفقاز بستر خزر را به دو گودال شمالی و جنوبی تقسیم می کند و بر اساس میانگین گودی ، به سه بخش شمالی (میانگین ۶ متر)، میانی (میانگین ۱۷۵ متر) و جنوبی (میانگین ۳۲۵ متر) تقسیم می شود. خزر میان ۵۵ - ۴۲ درجه طول شرقی و ۴۸ - ۳۶ درجه عرض شمالی در راستای شمال غربی - جنوب شرقی جای می گیرد. میانگین طول آن ۱۲۶۰ کیلومتر و عرض آن ۳۰۰ کیلومتر بوده و پهنه ای به اندازه ۳۹۰/۰۰۰ - ۳۵۰/۰۰۰ کیلومتر مربع و پیرامونی برابر با ۶۳۷۹ کیلومتر دارد . آبخیز دریای خزر که بزرگترین در دنیا است ۳-۳/۵ میلیون کیلومتر مربع می باشد که نه کشور همسایه را در بر می گیرد. شوری آب خزر بین ۱۴-۱۲ گرم در هزار است (۴) .

بیشتر آب دریای خزر از پهنه ای که ولگا بیش از ۸۰٪ آن را تأمین می کند به دست می آید. کرانه ایرانی خزر مساحتی برابر با $\frac{1}{27}$ خاک ایران دارد. دمای آب خزر در دو فصل سرد ۱۶-۰ و در دو فصل گرم ۲۷-۲۴ درجه سانتیگراد است . دریای خزر میان جمهوری های روسیه، قزاقستان، اسلامی ایران، ترکمنستان و آذربایجان جای دارد. مرز ساحل ۹۹۲ کیلومتری ایران در غرب به رود آستارا و در شرق به رود اترک می رسد . دریای خزر از گذرگاه های بی جایگزین میان اروپا، آسیا و افریقا به شمار می رود (۴). در دریای خزر بیش از صد گونه ماهی زندگی می کند که برخی از آنها بخشی از زندگی خود را به ویژه در فصل تخم ریزی در رودها و تالاب های خزر می گذرانند .

بیشترین خاویار طبیعی جهان از تاس ماهیان دریای خزر به دست می آید. نبود قانون های مالکیت و بهره برداری غیر مجاز و تغییرات آب و هوایی همراه با افزایش تنوع و میزان آلودگی های آب از جمعیت ماهیان بویژه ماهیان خاویاری و تولید خاویار کاسته و به ارزش آن بسیار افزوده است. پرورش و رهاسازی بچه ماهی جهت افزایش جمعیت و حمایت از گونه های تاس ماهیان و به موازات آن پرورش صنعتی ماهیان خاویاری و تولید خاویار تنها راه های زود بازده در برابر نابسامانی های گفته شده است، اگرچه می توان در درازمدت به تعیین رژیم های حقوقی و مکانیسم های حفاظت محیط زیست و ممانعت از صید غیرمجاز و تجارت غیر قانونی نیز امیدوار بود.

از گونه های ماهیان جنوب دریای خزر ۸۱ تاکسون^۱ ماهی شناسائی شده که در بردارنده ۵۲ جنس، ۱۷ خانواده و ۱۰ راسته می باشند. حوضه جنوبی دریای خزر یکی از متنوع ترین اکوسیستم های آب شیرین ایران است و فقط ۱۳ گونه بومی از گونه های این حوضه در سایر حوضه های ایران وجود دارد (۶).

۲- ماهیان :

از جانداران شناخته شده ، ماهیان در خاستگاه^۱ یوکاریوت ها^۲ جای می گیرند. ماهیان از سلسله^۳ جانوران بوده و از آن رو که بسیار زودتر از دیگر مهره داران به تکامل رسیده اند از مهره دارانی مثل پستانداران بسیار ناهمگون تر^۴ بوده و گوناگونی تکاملی بیشتری دارند (۴۳ ، ۸۹) .

در بررسی های بیولوژیک به ویژه فیزیولوژیک وابستگی یا همبستگی میان کارکردهای سلولی یا اندامی میان طنابداران^۵ خونسرد (مثل ماهیان، دوزیستان و خزندگان) بسیار بیشتر از طنابداران خونگرم (مثل پرندگان و پستانداران) به چشم می خورد (۸۹).

۲ - ۱- رده بندی ماهیان :

در رده بندی^۶ از نظر فیلوژنی ماهیان از شاخه^۷ طنابداران و بخش^۸ مهره داران^۹ می باشند. مهره داران خود از رده های^{۱۰} بی آروارگان^{۱۱} ، ماهیان غضروفی^{۱۲} ، ماهیان استخوانی^{۱۳} ، دوزیستان^{۱۴} ، خزندگان^{۱۵} ، پرندگان^{۱۶} و پستانداران^{۱۷} تشکیل می شوند . جانورانی که واژه ماهی را بر خود دارند و در

1- Taxon

¹ - Domain

² - Eukarya

³ - Kingdom

⁴ - Animalia

⁵ -Heterogenus

⁶ - Crodata

⁷ - Systematic

⁸ - Phylum

⁹ - Division

¹⁰ - Vertebrata

¹¹ - Class

¹² - Agnatha

¹³ - Chondrichthyes

¹⁴ -Osteichthyes

¹⁵ - Amphibia

¹⁶ - Reptilia

¹⁷ - Aves

¹⁸ - Mammalia

سه رده نخست جای گرفته اند را در جایگاه اکتینو پتریگی^{۱۹} و نیز برخی دیگر را در جایگاه الاسموبرانشی^{۲۰} قرار می دهند (۴۱).

۲ - ۲ - رده بندی ماهیان خاویاری :

در رده ماهیان استخوانی گروهی از ماهیان وجود دارد که از اسکلت غضروفی برخوردار بوده و با افزایش سن به اسکلت استخوانی دست می یابند و از نظر تکاملی جایگاهی میان ماهیان غضروفی و استخوانی برای آنها در نظر گرفته می شود. این ماهیان در زیر رده Actinopterygii گروه بندی شده و ارزشمندترین آنها راسته تاس ماهی شکلان (Acipenseriformes) می باشد. در این راسته خانواده تاس ماهیان (Acipenseridae) دارای چهار جنس *Acipenser*، *Huso*، *Pseudoscaphirhynchus* و *Scaphirhynchus* می باشد (۴۱، ۲، ۹۹).

جنس «فیل ماهی» خود از بلوگا (*Huso huso* یا *Beluga sturgeon*) و کالوگا (*Kaluga*) (*A. dauricus*، *Huso*، *Sturgeon*) و نیز جنس تاس ماهیان از گونه هائی مثل تاس ماهی سبیری (*A. baerii*) با دو زیر گونه تاس ماهی سبیری (*Siberian sturgeon*، *A. b. baerii*) و تاس ماهی بایکال (*Baikal sturgeon*، *A. b. baicalensis*) همچنین تاس ماهی پوزه کوتاه (*Shortnose sturgeon*، *A. brevirostrum*) تاس ماهی یانگتسه (*Yangtze sturgeon*، *A. dabryanus*)، تاس ماهی دریاچه ای (*Lake sturgeon*، *A. fulvescens*) تاس ماهی روسی یا چالباش (*Russian sturgeon*، *A. gueldenstaedtii*)، تاس ماهی سبز (*Green sturgeon*، *A. medirostris*)، تاس ماهی ساخالین (*Sakhalin sturgeon*، *A. mikadoi*)، تاس ماهی ژاپنی (*Japanese sturgeon*، *A. multiscutatus*)، تاس ماهی آدریاتیک (*Adriatic sturgeon*، *A. naccarii*)، تاس ماهی شیپ (*A. nudiventris*) یا Spiny sturgeon، تاس ماهی سیاه (*A. oxyrinchus*) با دو زیر گونه تاس ماهی خلیج *A. o.* (*Gulf sturgeon* یا *desotoi*) و تاس ماهی آتلانتیک (*A. o. oxyrinchus* یا *Atlantic sturgeon*)، تاس ماهی ایرانی یا قره برون (*A. persicus* یا *Persian sturgeon*)، تاس ماهی رودخانه ای (*A. ruthenus* یا *Sterlet sturgeon*)، تاس ماهی آمور (*A. schrencki* یا *Amur sturgeon*)، تاس ماهی چینی (*A. sinensis* یا *Chinese sturgeon*)، ازون برون یا دراکول (*A. stellatus*) یا *Starry sturgeon*، تاس ماهی اروپائی یا بالتیک (*A. sturio* یا *European sturgeon* یا *Baltic*)

¹⁹ --Actinopterygii

²⁰ - Elasmobranchii

sturgeon) و تاس ماهی سفید (*A. transmontanus* یا White sturgeon) تشکیل شده اند (۴۱، ۹۹، ۲).

در جنس *Scaphirhynchus* گونه های تاس ماهی رنگ پریده (*S. albus* یا Pallid sturgeon)، تاس ماهی پوزه پهن (*S. platyrhynchus* یا Shovelnose sturgeon) و تاس ماهی آلاباما (*S. suttkusi* یا Alabama sturgeon) و در جنس *Pseudoscaphirhynchus* گونه های تاس ماهی کوتوله (*P. hermanni* یا Dwarf sturgeon)، تاس ماهی سیر دریا (*P. fedtschenkoi*، Syr Darya sturgeon) و تاس ماهی آمودریا (*P. kaufmanni*، Amu Darya sturgeon) قرار گرفته است. (۴۱، ۹۹، ۲). پارو پوزه ها^۱ به راسته تاس ماهیان تعلق دارند و از خانواده پردندانان^۲ می باشند. گونه پاروپوزه چینی (*Psephurus gladius*) و پاروپوزه آمریکایی (*Polyodon spathula*) تنها گونه های این خانواده هستند. در روند تکاملی ایمنی جانوران گروه های الاسموبرانشی و اکتینوپتریگی جایگاه ویژه ای دارند (۴۱، ۹۹، ۲).

۳- آناتومی و فیزیولوژی بافت و اندام های خونی - لنفی :

همه حیوانات بسته به اندازه پیچیدگی و تاریخ تکامل خود توانسته اند عوامل آسیب رسان را از خود دور کنند. جانوران بی مهره و مهره دار ایمنی غیر اختصاصی دارند، در حالی که ایمنی اکتسابی تنها در طناب داران و مهره داران به ویژه گروهی که از بی مهرگان طنابدار و ماهیان بی آرواره متکامل می شوند، وجود دارد. بی مهرگان ایمنی اختصاصی ندارند اما ایمنی غیر اختصاصی بسیار کارآمدی دارند. فاگوسیتوز و سلول های فاگوسیت کننده در همه سلسله جانوران دیده می شود، سلول های بسیار گوناگونی در بی مهرگان و مهره داران بیگانه خوار هستند، آنانی که در خون یافت می شوند را هموسیت^۳ و آنانی که در حفرات بدن یافت می شوند را سلوموسیت^۴ و آنانی که گاه در بافت ها دیده می شوند را هیسیتوسیت^۵ می نامند (۸۹).

ایمنی اکتسابی در بی مهرگان دیده نمی شود چرا که گیرنده های اختصاصی آنتی ژن را آن گونه که در مهره داران به چشم می خورد ندارند، ایمنوگلوبولین ها را نمی سازند و یاخته های لنفی ندارند. اگرچه در آنلیدها^۶ (مثل کرم خاکی) رد پیوند دیده می شود. این نوع ایمنی بسیار به طول می انجامد و توسط یاخته

^۱ - Paddel fish

^۲ - Polyodontidae

^۳ - Hemocyte

^۴ - Coelomocyte

^۵ - Histiocyte

^۶ - Annelids

های بیگانه خوار لنفوسیت مانند به انجام می رسند و اگرچه رد پیوند در بار دوم کمی زودتر و شدیدتر رخ می دهد ولی نشانه خاطره ایمنی نمی باشد و تنها با همکاری بیشتر سولوموسایت ها و هموسیت ها پدید می آید (۴۳، ۸۹).

در بررسی های ژنومی مشخص گردیده که در بی مهرگان شماری از پیش سازهای ژن های تکامل یافته در مهره داران مانند ژن زنجیره اتصالی ایمنوگلوبولین ها ، بتا دو میکروگلوبولین، کمپلمان، پروتئین های شوک گرمایی^۱، TNF^۲، IL_{1β}، IL_{1α}، CD₅، CH₅₆، CD₅₇ و IL₆ یافت می شود (۴۳، ۸۹).

چهار رده طنابدار زنده وجود دارد و ماهیان مهره دار ۵۰۰-۳۵۰ میلیون سال قبل و پیش از پستانداران تکامل یافته اند. آنگونه که سارکوپتریگی^۳، الاسموبرانشی و اکتینوپتریگی روند تکاملی ناهمگونی یافته اند. نخست ماهیان بی آرواره و همراه این گروه، ماهیان دهان گرد^۴ و غضروفی تکامل یافته اند (۴۳، ۸۹، ۷).

تکامل یافته ترین ماهیان، ماهیان استخوانی^۵ هستند که بیشترین ماهیان امروزی را در بر دارند و از آن رو که بسیار زودتر از پستانداران تکامل یافته اند گوناگونی بیشتری در ویژگی های دستگاه ایمنی آنها در میان رده های گوناگون و حتی در درون راسته های هر رده از آنها وجود دارد. پس از تکامل ماهیان، دوزیستانی مانند اورودلا^۶ (سمندر) و انوران^۷ (قورباغه) تکامل یافته اند و پس از تکامل آنها، خزندگان با سه زیر رده آناپسیدا^۸ (لاک پشت)، لپیدوسورا^۹ (سوسمار و مار) و ارکوسورایا^{۱۰} (کروکودیل و تمساح) پدید آمدند. پرندگان نخستین گروه خونگرم ها هستند و بیشترین تکامل فیزیولوژیک را به دست آورده اند. پستانداران سه راسته دارند که شامل مونوترم ها^{۱۱} و پستانداران تخمگذار (پلاتی پوس و اکیدنه)، کیسه داران^{۱۲} (کانگورو و اپوسوم) و رحم داران که در آنها ایمنی به تکامل امروزی خود رسیده است، می باشد (۴۳، ۸۹، ۷).

۳- ۱- ایمنی غیر اختصاصی :

¹ - Heat shock protein

² - Tumor necrosis factor

³ - Sarcopterygii

⁴ - Cyclostomate

⁵ - Teleost

⁶ - Urodela

⁷ - Anura

⁸ - Anapsida

⁹ - Lepidosauras

¹⁰ - Archosauria

¹¹ - Monothermes

¹² - Marsopiales

همه مهره داران می توانند آماس حاد را نیز علاوه بر آماس مزمن به نمایش بگذارند. گرانولوسیت ها ، ماکروفاژها و لنفوسیت ها به بسیاری از بافت ها مهاجرت می کنند و اغلب مراحل این روند در مهره داران همانند آنچه در پستانداران رخ می دهد می باشد، اگرچه در ماهیان گرانولوسیت ها زودتر از دیگر سلول ها خود را به محل آماس می رساند و تا ۲۴ ساعت به بیشترین تعداد خود می رسند. در پستانداران مهاجرت دوره دوم از سوی ماکروفاژها و بسته به چگونگی پاسخ ، راهیابی لنفوسیت ها نیز رخ خواهد داد. گرانولوسیت ها از سوی لوکوترین ها فراخوانده می شوند و ماکروفاژها پس از ۷-۲ روز به بیشترین شمار خود می رسند (۸۹ ، ۴۳ ، ۲۷).

در ماهیان گرانولوسیت ها از کلیه قدامی و ماکروفاژها از مونوسیت های خونی به وجود می آیند. ماکروفاژهای بافتی در مزانتر، طحال، کلیه و بطن های قلب جایگیر می شوند، بسیار بیگانه خوار بوده و رفتاری مانند ماکروفاژهای پستانداران از خود به نمایش می گذارند و مولکول های گیرنده کمپلمان سه را نیز دارند. آنتی بادی های ماهیان توان مشهی گری^۱ نداشته یا توان بسیار اندکی دارند. بود و نبود و کارکرد گرانولوسیت ها در رده های ماهیان گوناگونی بسیار دارد. دهان گردان ائوزینوفیل هائی با گرانول های همسان و گرد دارند در حالی که ماهیان غضروفی ائوزینوفیل هایی با گرانول های کشیده و کریستالی همانند آنچه در پستانداران هم دیده می شود، دارند (۸۹ ، ۴۳ ، ۲۷ ، ۸۱).

ائوزینوفیل های ماهیان استخوانی گرانول های گرد همگون دارند. در بی آرواره ها گرانولوسیت ها دارای گرانول های کوچک بسیار متراکمی هستند که شاید بتوان آنها را اجداد نوتروفیل ها به شمار آورد . ماهیان غضروفی نوتروفیل های مشخص و ائوزینوفیل های واضح دارند. در ماهیان استخوانی گرانولوسیت ها جنس به جنس و گونه به گونه متفاوتند. شماری از گونه ها نوتروفیل یا ائوزینوفیل ندارند و ندرتاً یاخته های بازوفیلی دارند. نوتروفیل های ماهیان استخوانی از نظر کارکرد و ریخت بسیار شبیه پستانداران بوده و در روندهای آماسی و پرشمارتر دیده می شوند. آنها توان بیگانه خواری داشته و در پاسخ ایمنی شمار آنها بیشتر می گردد. بسیاری از آنزیم هائی که در پستانداران مشاهده می شوند را دارند . گمان بر این است در گروهی از گونه های ماهیان استخوانی کشتار سلول هدف نه در درون نوتروفیل بلکه در بیرون سلول به انجام می رسد بازوفیل ها در الاسموبرانش ها همواره وجود دارند. در ماهیان رهاسازی گرانول های نوتروفیلی آسیب بافتی بسیاری به وجود می آورد. چرا که ماهیان خونسرد هستند و سلول های بافت چربی آنها حاوی اندازه بسیار زیادی از چربی های اشباع نشده است که می توانند به سرعت اکسید شده و رادیکال های آزاد، بافت های چربی را تخریب کنند. ماهیان بایستی راه پر توانی برای بازداري از این روند داشته باشند. در بافت لنفی بسیاری از ماهیان استخوانی سلول های ملانین دار بسیار یافت می شوند چرا که

ملانین می تواند رادیکال های آزاد اکسید کننده را خنثی کند و اثرات ناخواسته بیگانه خواری و رهاسازی گرانول ها را خنثی نماید (۸۹، ۴۳، ۲۷، ۸۱).

سیتوکین هائی مثل IL_1 ، MA factor، ایکوزونوئید ها^۱ همچون لوکوترین ها^۲، لیپوکسین ها^۳ و پروستاگلندین ها^۴ واسطه های آماسی ماهیان هستند.

۳-۲- ایمنی اکتسابی :

هرچه مهره داران متکامل تر می شوند، یاخته ها، بافت ها و اندام های لنفی آنها پیچیده تر خواهد شد و کارکردهای گوناگون تر خواهد یافت (۸۹، ۲۸، ۳۴، ۳۶، ۱۰۱).

مغز استخوان :

رشد و نمو مغز استخوان به تکامل استخوان ها و چگونگی ساختمان آنها بستگی دارد، از این رو مغز استخوان تا زمانی که مهره داران به خشکی بیایند به وجود نیامد. شماری از سمندرهای بدون ریه در درون استخوان های بلندشان تا اندازه ای بافت ها و یاخته های لنفی دارند. مغز استخوان کامل نخستین بار در دوزیستانی مثل قورباغه ها و سپس در خزندگان، پرندگان و همه پستانداران پدید آمده است (۸۹، ۲۸، ۳۴، ۳۶، ۱۰۱).

تیموس :

در دهان گردان بافت یا اندام تیموسی قابل شناخت نیست. تیموس نخستین بار در ماهیان غضروفی و پس از آن در ماهیان استخوانی - غضروفی و استخوانی درست در بالای حلق و میان نخستین کمان های آبششی پدید آمده است. در ماهیان کوچک نابالغ کیسه هایی در حلق به تیموس تکامل می یابند و آنتی ژن را از آب دریافت می کنند. نبود تیموس در ماهیان با کاهش سرعت و توان رد پیوند همراه خواهد بود و پاسخ هومورال را به وسیله کاهش آنتی بادی ها دچار نابسامانی می کند. آنتی بادی ها و همچنین سلول های دریافت کننده آنتی ژن به هنگام پاسخ ایمنی در تیموس ماهیان به چشم خواهند خورد که نشانه تکامل

^۱ - Icosonoides

^۲ - Leukotrienes

^۳ - Lipoxins

^۴ - Prostaglandins

یاخته هایی همانند لنفوسیت های B و یاخته هایی همانند لنفوسیت T در این اندام می باشد (۴۸، ۱۰۲، ۸۱).

کارایی تیموس در ماهیان مسن کم شده و در پاسخ به هورمون ها و دگرگونی های فصلی دچار کم کاری می گردد ولی در بسیاری از ماهیان مسن همچنان وجود دارد و از بین نمی رود (۸۹، ۴۳، ۲۸، ۳۴، ۳۶، ۱۰۱، ۴۸، ۱۰۲، ۸۱).

همه دوزیستان دم دار تیموس دارند که از کیسه های حلقی سوم، چهارم و پنجم پدیدار می گردد. تیموس آنها به آهستگی رشد می کند و در هفتمین سال زندگی قابل شناسائی است. نبود تیموس و یا جداسازی آن رد پیوند را مهار نموده و یا از شدت آن می کاهد، در ماهیان و این دوزیستان نمی توان در تیموس دو لایه کورتکس و مدولا را باز شناخت. تیموس در دوزیستان آنوران در یک سالگی رو به کم کاری می گذارد و به هنگام دگردیسی تا بلوغ پیشرفت این روند کاسته شده و بازیابی می شود. در قسمت خارجی تیموس لنفوسیت های تکثیر شونده بسیاری وجود دارد ولی در قسمت داخلی تعداد کمتری لنفوسیت وجود دارد و در برابر، ذرات تیموسی و سلول های میلوئید جای گرفته اند. در بیش از ۸۰٪ سلول های تیموسی یاد شده مولکولهای ایمنوگلوبولین دیده می شوند. در این دوزیستان نبود تیموس یا برداشت آن پاسخ های رد پیوند را دچار نابسامانی می کند ولی از پاسخ های هومورال چندان کاسته نمی شود. از این رو می توان گفت پاسخ ایمنی وابسته به لنفوسیت های T نخستین بار در این جانوران به وجود آمده است. جداسازی تیموس در لارو منجر به توسعه تأخیری پاسخ های وابسته به T می شود و نشانگر آن است که در این حیوانات رشد و نمو لنفوسیت های T در خارج از تیموس نیز انجام پذیر است. تیموس خزندگان از کیسه های حلقی گوناگون (بسته به نوع خزنده) پدید می آید و بافت شناسی آن همانند آنچه در دیگر مهره داران عالی دیده می شود است. کاهش رشد و کارکرد تیموس به سن و تغییر فصل وابسته می باشد و بازگشت کارکرد آن در فصل گرم پس از یک دوره کاستی در فصل سرد بسیار گزارش شده است. تیموس در پرندگان و پستانداران نخستین همانند پستانداران رحم دار است (۸۹، ۴۳، ۲۸، ۳۴، ۳۶، ۱۰۱، ۴۸، ۱۰۲، ۸۱).

طحال :

طحال نخستین بار در ماهیان غضروفی و سپس استخوانی پدیدار گشته است و دهان گردان از آن بی بهره اند. بافت شناسی و کارکرد آن تشابه زیادی با پستانداران دارد. در ماهیان استخوانی و دوزیستان اورودل^۱، پالپ قرمز و سفید جدای از هم نیستند و در دوزیستان آنوران و پالپهای طحال با لایه ای از سلول های

^۱ - Urodel

«بینابینی»^۲ از یکدیگر جدا می شوند. در همه خزندگان طحال دو پالپ سفید و قرمز جدا از هم دارد. دوزیستان و خزندگان مراکز زایگر طحال ندارند چرا که این ویژگی اولین بار در پرندگان به خوبی پدیدار شده اند (۸۹، ۴۳، ۲۸، ۳۴، ۳۶، ۱۰۱، ۴۸، ۱۰۲، ۸۱).

غدد لنفی :

نخستین بار و به وضوح در شماری از دوزیستان آنوران غدد لنفی دیده شده ، بطوریکه این پیش سازهای گره های لنفی از یک توده انباشته لنفوسیتی که از توسط سینوزوئیدهای خونی در بر گرفته شده اند به وجود آمده اند و بیشتر خون را پالایش می کنند تا آنکه لنف را پالایش کنند. گره های لنفی - میلوئیدی که بسیار شبیه غدد لنفی شناخته شده در خزندگان هستند، ساختاری ساده دارند که یک پارانشیم لنفوئیدی به همراه بیگانه خوارها و سینوزوئیدهای درون خزیده به آن هستند این غده های لنفی نخستین در آئورت، سیاهرگ های آوران دهلیزی و سیاهرگ های گردن پراکنده اند. اگرچه چنین پنداشته می شود که پرندگان فاقد گره های لنفی اند ولی دارای ساختارهایی همگون و هم کارکرد می باشند . اندام های شبیه گره لنفی در پرندگان از یک سینوس میانی که همان آوند میانی رگ لنفی است و در گرداگرد خود با پوششی از بافت های لنفی در بر گیرنده مراکز زایگر پوشیده شده ، پدید آمده است . این گره ها کیسول خارجی ندارند. در پستانداران خونگرم گره های لنفی ساختاری ویژه دارند . چندین گرهک لنفی که هر یک، مرکزی زایگر و در بر گرفته شده با سازماندهی رگ های خونی دارند و در هر گره یک حفره میانی با شبکه ای از آوندهای لنفی به چشم می خورد ، از این رو هر گرهک در استخری از لنف شناور بوده و از شبکه ظریف خونی ، آنتی ژن و یاخته های لکوسیتی را تبادل می کند (۸۹، ۴۳، ۲۸، ۳۴، ۳۶، ۱۰۱، ۴۸، ۲۷، ۸۱).

بافت های لنفی همراه دستگاه های بدن (O.A.L.T)^۱ :

الف- بافت های لنفی همراه گوارش (G.A.L.T)^۲ :

تجمعی از سازماندهی سلولی، بافتی و گاه لنفی در نزدیکی دستگاه گوارش مهره داران به چشم می خورد . نخست در دهان گردان تجمع پراکنده سلول های لنفی ، دستگاه گوارش را همراهی می کند که در ماهیان متکامل تر گسترش بیشتر و سازماندهی کامل تری می یابند. ساختارهای لنفی - میلوئیدی سازنده گرانولوسیت ها در مری (اندام لیدیک) و همچنین غدد جنسی (اندام اپی گونال) ماهیان غضروفی دیده می شود. گروهی از گونه ها هر دو و گروهی دیگر تنها یکی از آن دو را دارند. انباشت یاخته های لنفی با

²- Interstitial

¹- Organ Associated Lymphoid Tissues

²- Gut Associated Lymphoid Tissues

سازماندهی گره ای در دوزیستان اورودل دیده نشده و نخست در آنوران ها دیده می شود. لنفوسیت ها و پلاسماسل ها در گرهک های لنفی - روده ای بیشتر مهره داران عالی دیده می شود. شماری از لاک پشت ها و مارها ساختارهای لنفی دارند که تا درون فضای کلوای پیش می روند که شبکه کلوای خوانده می شود و با افزایش سن و پس از بلوغ گسترش و تکامل بیشتری می یابند؛ از این رو نمی توان آنها را بافت یا اندام لنفی اولیه به شمار آورد یا آنکه پیش ساز بورس فابریسیوس^۱ در پرندگان مهره دار دانست. بورس فابریسیوس با بخشی بسیار ویژه از بافت های لنفی همراه گوارش به شمار می رود که تنها در پرندگان و درست در بالای کلوک جای می گیرد و عملکردی همانند تیموس دارد. جز آنکه در رشد و نمو یاخته های B نقش داشته و گاه نقشی ویژه تر را به نمایش می گذارد. در بافت اپی تلیال لنفوسیت ها پراکنده بوده و گرداگرد یک فضای خالی که با یک آوند به کلوک راه می یابد جای گرفته اند. چین هائی از اپی تلیوم و بافت بینابینی به درون این فضای کروی راه یافته و فولیکول های لنفی در درون آنها پدید می آید. هر فولیکول دارای لایه پیرامونی کورتکس و لایه درونی مدولا می باشد. کورتکس دارای لنفوسیت ها، پلاسماسل ها و ماکروفاژها بوده و لنفوسیت های بالغ در مرکز فولیکول جای گیر می شوند. سلول های دنداندار^۲ ترشحی ویژه ای در مدولا پراکنده اند. بورس فابریسیوس با افزایش سن رشد یافته و پس از بلوغ تحلیل می رود و ناتوان می شود. نبود بورس یا جداسازی آن باعث کاهش یا حذف آنتی بادی ها و سلول های تولید کننده آنها و تعداد لنفوسیت های گردش خون شده و رد پیوند ضعیف می شود چرا که فعالیت سلول های لنفی باز دارنده بسیار افزایش می یابد. هر چند اثر کمتری بر ضعف پاسخ ایمنی وابسته به T به وجود خواهد آمد، می توان بورس را اندام لنفی اولیه معادل با تیموس ولی ویژه لنفوسیت های B برشمرد، با این وجود کارکرد اندام های لنفی ثانویه نیز برای آن شناخته شده است. بورس آنتی ژن را به دام انداخته و جایگاهی برای تولید آنتی بادی است و کانون هائی از لنفوسیت های T نیز در خود دارد که بیشتر در آوند بورس و دریچه آن رو به سوی کلوک جای گرفته اند.

در گروهی از پرندگان تجمع بزرگی از سلول ها و بافت های لنفی در لوزه های راست روده و نیز

پوست وجود دارند که کارکردی شبیه به دیگر لنف های همراه اندامهای بدن دارند (۴۳، ۸۹، ۲۸، ۲۷).

ب- بافت های لنفی همراه کلیه (U.G.A.T):^۳

کلیه ماهیان دو بخش است: کلیه خلفی^۴ که یک اندام ترشحی است و نیز کلیه قدامی^۵ که یک اندام لنف ساز با شمار بسیاری از سلول های سازنده آنتی بادی ها و یاخته های بیگانه خوار می باشد و می توان آن را

^۱ - Fabrisius bursa

^۲ - Dendritic cell

^۳ - Urinarg Associated Lymphoid Tissues

^۴ - Opisthonephros

خونساز دانسته و همسان مغز استخوان دیگر مهره داران و نیز گره های لنفی به شمار آورد. در دوزیستان کلیه ها توان لنف سازی را از دست می دهند. سلول های بنیادی از بخش بین توبولی کلیه در دوزیستان اورودل و آنوران برخاسته و شمار بسیار کمی از لنفوسیت ها در کلیه خزندگان دیده خواهد شد (۴۳، ۸۹، ۲۸، ۲۷).

ج- اندام های لنفی دیگر :

در ماهیان تجمعی از یاخته های ماکروفاژی با رنگدانه هائی مانند ملانین و هموسیدرین به چشم می خورد. این جایگاههای ملانوماکروفاژی در طحال، کبد و کلیه دیده می شود و آنتی ژن های به دام افتاده در آنها تا مدت های طولانی باقی می ماند. این مراکز ممکن است کارکردی همانند با دیگر مراکز زایگر شناخته شده در مهره داران عالی تر داشته باشند. در دوزیستان چنین مراکزی در نای وجود دارد که سینوزوئیدهای در برگرفته شده از سوی ماکروفاژها آنتی ژن های خونی و لنفی را به دام می اندازند تا اندازه ای به پاکسازی و ساخت آنتی بادی برای آنتی ژن های محلول کمک نماید. در ماهیان، دوزیستان و خزندگان شمار بسیار زیادی از لنفوسیت ها در نواحی زیر کپسولی کبد وجود دارد. این انباشتگی لنفوسیتی تنگاتنگ سینوس های خونی بوده و کارکرد لنف سازی دارد (۴۳، ۸۹، ۲۸، ۲۷).

۳-۳- پاسخ ایمنی :

اولین بار آرایش و کارائی ژن های سازنده گیرنده سلول لنفی T^۱ و گیرنده سلول لنفی B^۲ در مهره دارانی مثل ماهیان غضروفی و استخوانی امکان پذیر شده است. در ۴۵۰ میلیون سال قبل با گذشت صد میلیون سال انجام نوترکیبی برنامه ریزی شده در پاره های ژن های نوپدید خانواده ایمنوگلوبولینی در ساخت گیرنده های T و B تکامل یافته است . با سازماندهی آرایه های جایگاه های پیوند با آنتی ژن در TCR و BCR کارکرد ویژه ای پدیدار شده است تا برای نخستین بار مهره داران بتوانند به آنتی ژن های از پیش برنامه ریزی شده با ویژگی فراوان پاسخ دهند. میدانیم که روند پیدایش شناسائی و پاسخدهی ویژه به آنتی ژن ها در ایمنی غیر اختصاصی با پیدایش و تکامل لکتین ها، کمپلمان و گیرنده های لنفوسیت های NK در مهره داران نیز همین گونه بوده است (۴۳، ۸۹، ۲۸، ۳۴، ۳۶، ۱۰۱، ۲۷).

۳-۳-۱- ایمنوگلوبولین ها :

^۵- Pronephros

^۱- T cell receptor (TCR)

^۲- B cell receptor (BCR)

در دهان گردان مولکول هائی ساخته می شود که می توانند به آنتی ژن پیوند یافته و بیگانه خواری آنها را توسط لکوسیت ها بهبود بخشند، همچنین مولکول هایی بر روی یاخته های لنف مانند نیز یافت می شوند که از ایمنوگلوبولین ها نبوده و همگون با کمپلمان ها هستند ، چون آرایه های اسید آمینه آنها مولکول های کمپلمانی را به یاد می آورد و پیوندهای " تیواستر " پنهان نیز بر این گمان افزوده است . ایمنوگلوبولین های حقیقی ابتدا در ماهیان غضروفی یافت می شوند و همان گونه که BCR پدید می آید پیام ژنتیکی رونوشت برداری ساخت مولکول و نوترکیبی پاره های VJC نیز به گردش در می آید، اگرچه ناهمانندی هائی با چگونگی سازماندهی ژن ها و پاره های ژنی در بخش های ژنومی فعال کروموزوم ها میان این جانوران و مهره داران عالی دیده می شود، الگوی همانندی آنها بسیار چشمگیر تر است. در ماهیان غضروفی خوشه هایی از آرایه های پاره های ژنی VDJ و C مشخص است که اغلب دوگانه می باشد، گمان می رود ۵۰۰-۲۰۰ خوشه از پیش آماده آرایش یافته ژنی در این ماهیان وجود دارد که اندازه ای با میانگین ۱۶ kb دارند و تنها نیمی از آنها کاربردی هستند، چنین نمودی درباره ژن های γ - TCR و β - TCR در پستانداران نیز شناخته شده است. در ماهیان استخوانی این الگو بسیار ناهمانند است و آرایشی از پاره های ژنی و همگون با روند نوترکیبی شناخته شده در دیگر مهره داران عالی تنها و گهگاه آرایش خوشه ای دارند که از الگوی VDJC با زنجیره های سنگین ویژه خود پیروی می کنند. نوترکیبی زنجیره های سبک ایمنوگلوبولین های این ماهیان دارای الگوی ژنی و نوترکیبی همانند با آنچه در ماهیان غضروفی گفته شده ، می باشد (۸۹، ۴۳، ۲۸، ۳۴، ۳۶، ۱۰۱، ۲۷).

در سلکانتها^۱ آرایه های ژن های ایمنوگلوبولینی همانند پستانداران می باشد. IgM قدیمی ترین کلاس ایمنوگلوبولینی است که نخست در ماهیان غضروفی و استخوانی دیده می شود در ماهیان غضروفی IgM مونومری و پتامری هر دو در سرم دیده می شود. در ماهیان استخوانی ایمنوگلوبولین ها مونومری و تترامری است . IgM تنها ایزوتیپی از ایمنوگلوبولین هاست که در ماهیان غضروفی دیده می شود. IgR و نیز IgW را می توان پیش ساز IgD و IgA دانست . ایزوتیپ های زنجیره سبک نیز در ماهیان غضروفی و استخوانی گزارش شده است که با کاپا و لاندا شناخته شده در مهره داران عالی همانند نیست. تعدادی از گیرنده های خانواده ایمنوگلوبولینی لنفوسیت های B در ماهیان غضروفی زنجیره سنگین ندارند. پوشش عروق ماهیان برای ایمنوگلوبولین ها بسیار تراوا تر است از این رو در همه مایعات درونی و تراوشهای بیرونی بدن ، ایمنوگلوبولین دیده می شود. IgY در برخی ماهیان، دوزیستان و خزندگان دیده می شود. IgY را می توان پیش ساز IgG و IgE در مهره داران عالی تر دانست، در دوزیستان اورودل، IgM مونومری ساخته می شود و در دوزیستان آنوران سه کلاس IgM (پتامری و یا هگزامری) ، IgY و IgS

^۱ - Coelocanth

و برخی ایمنوگلوبولین های کوچک تر مینیاتوری دیده می شود که هم در سرم و هم در تراوش هادیده می شود. در خزندگان IgY , IgM دیده می شود و نیز IgM آنها همانند مهره داران عالی می باشد. ایمنوگلوبولین اصلی خون پرندگان IgY است که سه زیر رده دارد، پرندگان IgM دارند که مونومری و ترشحی است . IgA تراوشی و پلیمری پرندگان هر دو مانند مهره داران عالی می باشند و IgD هم دارند. ژن V و D از پیش پیوند یافته است (VD) و تنها بخش J در زمان نوآرایی با آن پیوند می یابد تا بازآرایی ژنی انجام شود.

IgE و IgG اولین بار در خونگرم های اولیه و کیسه داران به وجود می آید، این جانوران هم IgM و هم IgA دارند ولی IgD در همه پستانداران دیده نمی شود (۸۹ ، ۲۸ ، ۳۴ ، ۳۶ ، ۱۰۱ ، ۱۰) .

۳-۲- تکامل پاسخ ایمنی هومورال^۱ :

همه آنتی ژن ها در ماهی ایمونوژن نیستند . پاسخ ایمنی و دما در ماهیان غضروفی رابطه مستقیم دارد. در دوزیستان آنتی ژن های محلول ایمونوژن هستند. به هنگام پاسخ ابتدا IgY و سپس IgM تولید می شود نخستین بار در خزندگان پاسخ ایمنی اولیه و ثانویه حتی در برابر پروتئین ها دیده می شود، در زمان پاسخ نخست IgM تولید می شود سپس IgY و پاسخ با آنتی بادی وابسته به سلول T است. در پرندگان پاسخ ایمنی اولیه IgM است و IgY در پاسخ ایمنی دوباره به وجود می آید. در پستانداران پاسخ ایمنی اولیه IgM و پس از آن IgG است. آنافیلاکسی در ماهیان استخوانی با الگوی شناخته شده دیده می شود اما هیستامین در گرانول های لوکوسیت ها یافت نشد و تنها افزایش گرانول های اتوزینوفیلیک که می توان آنها را همگون باماست سل^۲ های مخاطی پستانداران به شمار آورد ، شناخته شده اند. پاسخ های واکنش آنافیلاکتوئید یا آنافیلاکتیک را در دوزیستان و خزندگان می شناسیم و نشانه های آن در پرندگان هم همانندبا پستانداران است. مواد واکنشگر در این روند هیستامین ها، سروتونین ها، کینین ها و لکوترین ها هستند(۸۹ ، ۲۸ ، ۳۴ ، ۳۶ ، ۱۰۱ ، ۱۰) .

۳-۳- تکامل پاسخ ایمنی سلولی :

با توان بازآفرینی ژنی ، ماهیان غضروفی توان نوزائی TCR را دارند. این روند در ماهیان استخوانی همانند پستانداران وجود دارد. همه مهره داران MHC I , II و ژن های آنها را دارند از این رو آنها و دو زنجیره α و β بایستی پیش از پیدایش ماهیان غضروفی تکامل یافته باشند. نخستین بار در ماهیان استخوانی در میان

¹ - Homoral

² - Mast cell

³ - Major Histocompatibility Antigens

گذر ژنهای MHC I و MHC II در کروماتین سلول ژن هائی قرار دارند که کمپلمان ها را می سازد. در ماهیان دهان گرد با افزایش دما رد پیوند زیاد می شود ، خاطره ایمنی سلولی به وجود می آید و تعداد سلول های لنفی زیاد می شود، با این وجود رد پیوند تنها وابسته به مکانیسم ایمنی غیر اختصاصی است. رد پیوند در ماهیان غضروفی کندتر از ماهیان استخوانی است و خاطره ایمنولوژیک ایجاد می کند. لنفوسیت ها کارکردی فعال دارند و مقدار پاسخ سلولی متناسب با دما است (۸۹، ۲۸ ، ۳۴ ، ۳۶ ، ۱۰۱ ، ۸۱) .

در دوزیستان لنفوسیت های T ، رد پیوند ، خاطره ایمنی و افزایش پاسخ ایمنی دیده می شود. با تکامل، سرعت این پاسخ زیاد می شود که با دما رابطه مستقیم دارد. ازدیاد حساسیت تأخیری (DTH)^۱ در دوزیستان برای اولین بار دیده می شود، با تحلیل تیموس توان ایمنی سلولی و هومورال کاهش می یابد . این جانوران MHC I, II, III دارند و برای نخستین بار MHC IV نیز در این جانوران دیده می شود. MHC II بیشتر بر لنفوسیت های B و اپی تلیوم فعال است و MHC I تنها پس از دگر دیسی به وجود می آید. رد پیوند با دما وابسته است، واکنش پیوند در برابر میزبان^۲ برای اولین بار دیده می شود (۸۹، ۲۸ ، ۳۴ ، ۳۶ ، ۱۰۱ ، ۸۱) .

در پرندگان لنفوسیت های T به میتوز ها پاسخ می دهند. لنفوسیت های T در پاسخ تأخیری ازدیاد حساسیت تیپ IV، پیوند در برابر میزبان و رد پیوند بکار می افتند .

رابطه پاسخ ایمنی ماهی با دما مستقیم است و با کاهش دما تا بی پاسخی نیز پیش می رود و در برابر پاسخ ایمنی به آنتی بادی تنها در دوره هایی خاص به دما وابسته است. پاسخ ایمنی ثانویه وابستگی دمائی کمتری دارد و گمان می شود که لنفوسیت های T یاور به دما بیشتر وابسته بوده و پاسخ دهی آنها یا اینترلوکین ها در برابر دما آسیب پذیرتر است. تب تنها در خونگرم ها دیده نمی شود و روشن است که در ماهیان و خزندگان نیز رخ می دهد . تب روندی فیزیولوژیک و وابسته به پاسخ ایمنی است، با این وجود هرچه دمای محیطی ثابت تر باشد، خونسردها این ویژگی ها را بیشتر از دست می دهند و در تعدادی از پستانداران که دوره های تنظیم دمائی متغیر دارند (مثل برخی جوندگان، خرس و خفاش) با کاهش دمای بدن پاسخ ایمنی هومورال کاهش می یابد ، از اینرو که پاسخ ایمنی پستانداران در دمای کمی بالاتر از دمای پایدار و همیشگی بدن عملکرد بهتری دارد و تب در پاسخ به IL-1 و دیگر مولکول های تبزا چنین اثری را به بار می آورد (۸۹، ۲۸ ، ۳۴ ، ۳۶ ، ۱۰۱ ، ۲۷ ، ۸۱) .

^۱ – Delayed Type Hypersensitivity

^۲ - Graft versus Host

۴ - لکوسیت های خون ماهیان :

تعداد لکوسیتها در ماهیان بین ۱۵۰۰۰۰ - ۳۰۰۰۰۰ در میکرولیتر خون متغیر است و شامل لنفوسیت ها، مونوسیت ها و گرانولوسیت ها می باشد.

این لکوسیت ها بیشتر همان شکل و عملکرد فیزیولوژیک لکوسیت های پستانداران را دارند. تفاوت هائی در لکوسیتها در میان ماهیان از یک گونه به گونه دیگر وجود دارد. در ماهیان پرورشی با ارزش مثل آزاد ماهیان^۱ و کپور ماهیان انواع سلول ها به خوبی شناخته شده اند ولی در گونه های زیادی از ماهیان (بیش از ۴۰/۰۰۰ گونه) به خوبی بررسی نشده اند، بنابراین یک لوکوگرام برای تشخیص های بالینی نیاز است که داده هائی پایه از ماهیان تندرست داشته باشیم و بتوانیم در سنجش با آن ناهنجاریها را بررسی کنیم. چون لکوسیت ها در محیط های مختلف یکسان نمی مانند، پس باید داده هایی جداگانه از جایگاههای ویژه آزمایش شوند. در بسیاری از گزارشها ویژگی ریختی و کارکردی تنها بر پایه معیارهای مورفولوژیک ناکافی (مثل واکنش های رنگ پذیری با رومانوفسکی) است و پدید آمدن ظاهر همانند در انواع سلول های گوناگون مثل لنفوسیت ها، ترومبوسیت ها یا مونوسیت ها و گرانولوسیت ها شناسایی و ارزیابی لکوسیت ها را با سختی بسیار روبرو می کند. اگرچه بررسی مورفولوژیک یک روش ساده و مفید برای جداسازی و ارزیابی سلول هایی با کارکرد متفاوت است ولی بایستی ارزیابی کارکرد سلول را برترین راه شناسائی نوع سلول خونی بشمار آورد (۲۸، ۸۸، ۱۹، ۹، ۱۸، ۸۱، ۸). لکوسیت ها به ویژه گرانولوسیت ها در میان گونه های ماهیان دارای چهره ای بسیار ناهمانند هستند و این ویژگی موجب پیدایش سردرگمی در نامگذاری و رده بندی لکوسیت های ماهیان بر پایه آنچه در پرندگان و پستانداران در گسترش های خونی رنگ شده با رومانوفسکی دیده می شود، می گردد. بررسی فراساختاری^۲ سلولی، رنگ آمیزهای سیتوشیمیائی تفریقی، ایمنوفلورسانس و آزمون سنجش کارایی لکوسیت های ماهیان به کم کردن پاره ای اختلافات درباره برخی گونه ها و سلولها کمک می کند. بررسی های سیتوشیمیائی نشان می دهد که می توان از واژه هائی که برای نامگذاری لکوسیت های پستانداران بکار می رود برای رده بندی لکوسیت های ماهیان نیز استفاده کرد (۲۸، ۸۸، ۱۹، ۹، ۱۸، ۸۱، ۸).

۴-۱- گرانولوسیت های ماهیان غضروفی :

^۱ - Salmonids

^۲ - Ultrastructural

گرانولوسیت ها هم در تعداد و هم در نوع در میان گونه های ماهیان غضروفی یکسان نیستند و دسته بندی آنها بر پایه یافته های به دست آمده از پژوهشهای فراساختاری و سیتوشیمیائی به صورت زیر است :

گرانولوسیت های تیپیک G_1 (نوع I) دارای هسته غیر مرکزی، نامنظم و بدون تقسیم و همچنین سیتوپلاسم بدون رنگ با گرانول های سیتوپلاسمیک ائوزینوفیلیک گرد تا بیضی می باشند. هسته در شماری از گونه ها تقسیم شده است و این سلول ها هتروفیل های پرندگان را به یاد می آورند و بیشترین شکل گرانولوسیت ها هستند که به چشم می خورند (۸۸ ، ۱۹ ، ۱۸ ، ۹ ، ۳۸ ، ۶۵ ، ۸۱).

گرانولوسیت های G_2 (نوع II) هسته تقسیم شده و سیتوپلاسم بی رنگ دارند که در آن گرانول های مشخصی وجود ندارد. این سلول ها نوتروفیل های پستانداران را به یاد می آورند (۸۸ ، ۱۸ ، ۱۹ ، ۹ ، ۳۸ ، ۶۵ ، ۸۱ ، ۸).

گرانولوسیت G_3 (نوع III) با هسته تقسیم شده، سیتوپلاسم آبی کم رنگ و گرانول های گرد تا کشیده که بسیار ائوزینوفیلی هستند شناسائی می شوند. گرانول های سیتوپلاسمیک در گرانولوسیت های G_3 دارای چنان رنگی هستند که آنها را از گرانولوسیت های G_1 در همان گسترش خون متمایز می کند. گرانولوسیت های G_3 بسیار همانند ائوزینوفیل های پرندگان هستند. گرانولوسیت های ائوزینوفیلیک (G_1 , G_3) الاسموبرانش ها تنها بخش کوچکی از ویژگی های مورفولوژیک و سیتوشیمیائی ائوزینوفیل های پستانداران را دارا می باشند. کارکرد و ارتباط گرانولوسیت ها شناخته نشده است و گمان می رود بیشتر انواع سلول های تقسیم شده باشند تا یاخته های میانی یک نوع سلول . همه ماهیان دارای همه گونه های گرانولوسیت های گفته شده نیستند. بازوفیل ها بسیار کمیاب بوده و تنها در گسترش خون برخی ماهیان غضروفی دیده شده است (۸۸ ، ۱۸ ، ۱۹ ، ۹ ، ۳۸ ، ۶۵ ، ۸۱ ، ۸).

۴-۲ - گرانولوسیت های ماهیان استخوانی :

۴-۲-۱- نوتروفیل ها :

نوتروفیل های ماهیان استخوانی (اغلب به اشتباه هتروفیل خوانده می شوند) یکی از بزرگترین سلولها در گردش خون هستند و اغلب سلول هائی گرد تا کمی بیضی شکل با هسته غیر مرکزی هستند. هسته نوتروفیل های رسیده می توانند گرد، بیضی، دنداندار (متامیلوسیت)، کشیده و یا قطعه قطعه باشند که اغلب ۲-۳ قطعه دارند. هسته یکپارچه در گرانولوسیت های ماهیان استخوانی فراوان است. کروماتین هسته فشرده و در گسترش های رنگ شده با رنگ رومانوفسکی بسیار بازوفیلیک است. نوتروفیل ها در این ماهیان دارای سیتوپلاسم بی رنگ، مایل به خاکستری یا اندکی اسیدوفیلیک و گرانول های کوچک هستند . رنگ گرانول ها بسته به گونه و اندازه رسیدگی سلول متفاوت است و می تواند از خاکستری تا آبی کم رنگ

یا قرمز متفاوت باشد که معمولاً با میکروسکوپ نوری قابل مشاهده نیستند (۸۸، ۱۸، ۱۹، ۹، ۳۸، ۶۵، ۸۱، ۸).

اگرچه نوتروفیل های ماهیان استخوانی بسیار همانند نوتروفیل های پستانداران هستند اما ناهمانندی میان گونه ای نیز در واکنش های سیتوشیمیائی مشاهده شده است (۲۸ و ۸۸، ۹، ۱۸، ۱۹، ۳۸، ۸). نوتروفیل هایی که در رنگ های رومانوفسکی گرانول های سیتوپلاسمیک کشیده و گوناگون دارند را هتروفیل می نامند که هم اندازه یا کمی کوچکتر از نوتروفیل هستند. در برخی گونه ها چنین گرانولوسیت هایی با گرانول های سیتوپلاسمیک اسیدوفیلیک و سیتوپلاسم بدون رنگ، هسته غیرمرکزی و قطعه قطعه وجود دارد که اگرچه ویژگیهای سیتوشیمیائی شبیه نوتروفیل های دیگر ماهیان دارند بیشتر هتروفیل به شمار می روند (۸۸). به سختی می توان گفت که آیا یک سلول به درستی هتروفیلیک است یا بر اساس باوری نادرست که گونه های غیر پستاندار به جای نوتروفیل هتروفیل دارند، هتروفیل نامیده می شوند. یک گرانولوسیت با هسته قطعه قطعه غیر تیپیک که به هیچ یک از لکوسیت های پرندگان و پستانداران شبیه نیست نیز در خون برخی ماهیان دیده شده است. در بعضی گونه ها نوتروفیل ها دارای گرانول های سیتوپلاسمیک کشیده و یا بیرون زده ائوزینوفیلی هستند. نوتروفیل ها بیشترین گرانولوسیت های ماهیان هستند و در بعضی گونه ها هر دو دیده می شود. توان بیگانه خواری نوتروفیل ها در بسیاری از گونه های ماهیان شناخته شده است. در بسیاری ماهیان نوتروفیل ها اولین سلول هائی هستند که در طی ۲۴ ساعت اول به آسیب حاد پاسخ می دهند (۲۸، ۸۸، ۹، ۱۹، ۱۸، ۳۸، ۸).

۴-۲-۲- ائوزینوفیل ها :

ائوزینوفیل ها در خون ماهیان استخوانی کمتر گزارش شده و بیشتر محققان باور ندارند که سلول هائی که در گونه های کمی از ماهیان دیده شده ائوزینوفیل باشند.

گاهی گرانولوسیت های متوسط تا بزرگ با گرانول های مشخص کشیده یا کروی و سیتوپلاسم آبی کم رنگ با هسته گرد یا قطعه قطعه دیده می شود. این سلول ها از هتروفیل ها به وسیله یافته های سیتوشیمیائی و فراساختاری باز شناخته می شوند. گرانولهای کریستالوئیدی که نشانه ای برای ائوزینوفیل های پستانداران می باشند در ائوزینوفیل های ماهی همیشه دیده نمی شود (۲۸، ۸۸، ۹، ۱۹، ۳۸).

گرانول های ائوزینوفیل ماهیان در رنگ آمیزی رومانوفسکی در سنجش با سلول های پرندگان و پستانداران کمتر آشکار هستند و دارای چنان رنگ پذیری می باشند که آنها را از نوتروفیل های دارای گرانول های ائوزینوفیلیک متمایز می سازد.

سلول های همانند ائوزینوفیل ها در بافت های گوناگون بسیاری از ماهیان وجود دارد و در بسیاری از روندهای التهاب به ویژه آلودگیهای انگلی شرکت می کنند (۲۸، ۸۹، ۹، ۱۸، ۱۹، ۳۸، ۸).

۴ - ۲-۳- بازوفیل ها :

بازوفیل ها در خون ماهیان کمیاب هستند و تنها در شمار اندکی از گونه ها گزارش شده و اطلاعات کمی درباره شکل و عملکرد این سلول در دسترس است ولی تصور می شود که شبیه بازوفیل پستانداران باشند . بازوفیل ها سلول هائی گرد با گرانول های سیتوپلاسمیک گرد و بازوفیلی هستند که روی هسته را می پوشانند. هسته بزرگ، غیر مرکزی و گرد است. کروماتین درهسته یکنواخت است و شمار بازوفیل هاچنانچه دیده شود بسیار کم است (۲۸، ۸۹، ۹، ۱۸، ۱۹، ۳۸، ۸).

۴ - ۳- آگرانولوسیت های ماهیان :

۴ - ۳-۱- لنفوسیت ها :

دهان گردان دو گروه لکوسیت در خون دارند گروه نخست مونوسیت مانند بوده و گروه دیگر لنفوسیت مانند می باشند. سلول های لنفوسیت مانند(لنف گرد) از کلیه قدامی سرچشمه می گیرند. تنها ماهیان غضروفی و استخوانی لنفوسیت های حقیقی مشابه مهره داران عالی دارند . اندازه این سلول ها ۵-۸ میکرومتر است. بیشتر گرد یا نزدیک به گرد می باشند؛ نسبت هسته به سیتوپلاسم زیاد است. کروماتین هسته انبوه ، یکنواخت و بسیار بازوفیلیک است. سیتوپلاسم لنفوسیت های بالغ کوچک همگون و آبی کمرنگ بوده و گهگاه گرانول های سیتوپلاسمی آزروفیل ناپایدار دیده می شود . لنفوسیت های واکنشگر در گسترش خون ماهیان، لنفوسیت های پرندگان و پستانداران را با سیتوپلاسم فراوان بازوفیلیک و گهگاه شبکه گلژی متراکم به یاد می آورند . لنفوسیت هائی که بر غشاء خود ایمنوگلوبولین دارند، در تیموس، کلیه، طحال و خون دیده شده و می توان آنها را همانند لنفوسیت B مهره داران عالی دانست. ایمنوگلوبولین های غشائی ، گیرنده آنتی ژن بوده و آنتی گلوبولین ضد IgM دریافت آنتی ژن از سوی این لنفوسیت ها را مانع می شوند. لنفوسیت های ماهیان توان تبدیل شدن به پلاσμα سل را داشته ، آنتی بادی می سازند و در برابر آنتی ژن های LPS و PPD همانندسازی می کنند. لنفوسیت های ایجاد شده در کلیه قدامی تنها به آنتی ژن های الگو پاسخ داده و در برابر لنفوسیت های ایجاد شده از تیموس به هیچ یک پاسخ نمی دهند. لنفوسیت های T ماهیان را تنها با آنتی بادی های اختصاصی واکنش کننده با CD90 می توان شناخت. این لنفوسیت ها به میتوزن ها پاسخ می دهند. گروهی از لنفوسیت های T در ماهیان کارائی سلول های T یاور را داشته و لنفوسیت های B را برانگیخته و ساخت پادتن را افزوده و

بهبود می بخشند. سلول های لنفی NK¹ در گروهی از ماهیان استخوانی نیز شناخته شده اند که همانندی بسیاری با همانندان خود در مهره داران عالی دارند (۲۸ ، ۸۹ ، ۸۸ ، ۹ ، ۱۹، ۱۸ ، ۳۸).

۴- ۲-۳- مونوسیت ها :

مونوسیت ها در گسترش خونی بسیاری از گونه های ماهی گزارش شده و همانند مونوسیت های پرندگان و پستانداران هستند. این سلول ها بزرگ، تک هسته ای با سیتوپلاسم فراوان خاکستری - آبی تا آبی و بدون گرانول و دارای شماری واکوئول می باشند. مرز سیتوپلاسم به دلیل وجود پای کاذب مشخص نیست. شکل هسته گوناگون (از لوبیایی تا دو قسمتی) بوده و از ۵۰٪ حجم سلول کمتر است. کروماتین هسته مونوسیت ها گرانول دار بوده، نسبت به هسته لنفوسیت ها تراکم کمتری دارند. پژوهشهای فراساختاری نشان می دهد که مونوسیت ها در همه گونه های ماهی همانند سلول های دیگر مهره داران عالی هستند. واژه مونوسیت/ ماکروفاژ به فراوانی برای دسته بندی مونوسیت های ماهی استفاده می شود. چون این سلول ها می توانند به یکدیگر تبدیل شوند. مونوسیت یا ماکروفاژ در خون دیده می شود. بهتر است واژه مونوسیت برای سلول های خون و ماکروفاژ برای سلول های دیگر بافت ها بکار گرفته شود (۲۸ ، ۸۹ ، ۸۸ ، ۹ ، ۱۹، ۱۸ ، ۳۸).

مونوسیت ها گرایش بسیار به فاگوسیتوز دارند. سیتوکین ها آنها را تحریک می کنند. شاید در بسیاری از پاسخ های ایمنی شرکت کنند و همواره فاگوسیت کننده تک سلولی در التهاب مزمن هستند اما وابستگی آنها با دگر گونیهای لوکوگرام به خوبی شناسائی نشده است. شمار مونوسیت ها از لنفوسیت ها و گرانولوسیت ها کمتر است. (۲۸ ، ۸۹ ، ۸۸ ، ۹ ، ۱۹، ۱۸ ، ۳۸).

۵- روش های خون شناسی :

بررسی با دقت عناصر خونی نخستین گام در بررسی کارکرد خون و رسیدن به تشخیص از راه نشانه های خونی است. بسیاری از ناهنجاری ها، نابسامانی ها و بیماری ها را می توان با یافته های ویژه ای در آزمون هائی که بر روی خون به انجام می رسد ، شناخت یا در تشخیص تفریقی از آن بهره جست. بررسی درست ریخت شناسی سلول ها به همراه کیفیت و کمیت عناصر سلولی خون که وابسته به پارامترهای گوناگونی خواهد بود همگی بایستی به کار گرفته شوند تا راهنمایی درست و خوب باشد. گلبول های سفید در ساختار ایمنی شرکت می کنند و انواع گوناگونی دارند که هم ریخت شناسی ناهمگون و هم کارکردها و توانائی های متفاوت دارند. در پستانداران عالی پنج گروه گلبول سفید به طور طبیعی در گسترش خونی دیده می شود که شامل نوتروفیل ها، لنفوسیت ها ، مونوسیت ها ، ائوزینوفیل ها و بازوفیل هائی باشد .

1-Natural Killer

پلاکت ها را نیز می توان از این گروه دانست. بطور عمومی روشهای هماتولوژی که برای پستانداران بکار می رود با کمی تغییر برای ماهیها قابل استفاده است ولی در ماهیان بدلیل وجود گلبولهای قرمز هسته دار و اندازه لکوسیتها شمارش سلولها بایستی به صورت دستی انجام شود (۳۴، ۹۱، ۱۷، ۲۸).

پیش از برداشت خون باید به درستی روشن باشد که چه آزمونی هدف است و در برداشت نمونه، جابجائی، نگهداری، آماده سازی و چگونگی اجرای آزمایش آن را به یاد داشت (۳۴، ۹۱، ۲۸). در ماهیان از چندین جایگاه می توان خونگیری کرد اگر چه رگ دمی پشتی^۱ بیشتر بکار می رود. از جایگاههایی مانند خونگیری مستقیم از قلب و رگ مجرای گوارشی نیز استفاده می شود. خونگیری از قلب باعث آسیب فراوان می شود و رگ مجرای گوارشی نیز تنها برای نمونه گیری از ماهیان بزرگ استفاده می شود. نمونه گیری از سیاهرگ دمی نیز پیشنهاد نمی شود چون موجب آلودگی به مایعات بافتی و نیز مرگ ماهی می شود.

در ماهیان از ماده ضد انعقاد^۲ EDTA یا هپارین استفاده می شود (۳۴، ۹۱، ۱۷، ۲۸). انتخاب EDTA یا هپارین به منظور حفظ ریخت شناسی سلول بستگی به گونه ماهی دارد. در آزاد ماهیان و کپور ماهیان ظاهر سلول با هپارین حفظ می شود در حالیکه در گربه ماهی، ماهی باس^۳ و تیلپیا سلولها با EDTA بهتر حفظ میشوند. همولیز در خون ماهیان سریعاً رخ می دهد و بهتر است از سرنگ های ۱-۳ سی سی استفاده کرد (۳۴، ۹۱، ۱۷، ۲۸).

شمارش سلول ها از مهم ترین داده های قابل دسترسی در آزمون های خون است و کاربردهای فراوانی نیز دارد. در روش دستی مشاهده مستقیم با ابزارهایی همچون میکروسکوپ و در روش های خودکار دریافت ویژگی های هر سلول توسط عناصر فیزیکی یا فیزیکوشیمیایی به کار برده شده در دستگاه به انجام می رسد.

۵-۱- بررسی بیولوژیک لکوسیت ها :

بررسی ریخت شناسی، شمارش لکوسیت ها و تعیین نسبت آنها رایج ترین آزمایش هاست. در روش های خودکار امکان اشتباه در شمارش لکوسیت ها به علت عملکرد کرایوگلوبولین ها، کرایوفیبرینوژن، پلاکت های گرد هم آمده و گلبول های قرمز هسته دار و گوناگونی در اندازه یا شمارش تکه های هسته ای سلول ها وجود دارد.

^۱ - Coudal vein

^۲ - Ethylen diamin tetra acetic acid

^۳ - Bass

آنالیز لکوسیت ها به انجام می رسد تا درصد هر یک در خون به دست آید و در بررسی وضعیت موجود زنده از آن بهره برده شود اگر چه همواره باید به یاد داشت که گسترش را برای یافتن سلول های ناهنجار و یا پراکندگی نابسامان سلول های لکوسیتی به دقت بررسی نمود (۳۴، ۹۱، ۲۸).

شناسایی درست لکوسیت ها مهم ترین دشواری است که به کارآزمودگی آزمایش کننده وابسته است (۳۴، ۹۱، ۲۸).

امروزه با فراهم آمدن سیستم های خودکار بهبود یافته و استفاده از سیستم های فلوسایتومتری^۱ و بهره گیری از پیچیدگی ویژگی های سلولی و رنگ آمیزی ها و نمودهای اختصاصی هر سلول با هر یک از روش های رنگ آمیزی درستی شیوه های خودکار افزایش چشمگیر داشته است (۳۴، ۹۱، ۲۸).

با پیدایش روش رنگ آمیزی میلوپراکسیداز و ویژه بودن رنگ پذیری هر یک از لکوسیت ها در پاسخ به آن نخستین بار این امکان فراهم شده که در فلوسایتومتری بهبود حاصل شود.

شمارش کلی گلبول های سفید خون و همچنین نوتروفیل، لنفوسیت، مونوسیت و ائوزینوفیل با کمک واکنش میلوپراکسیداز به شیوه خودکار قابل سنجش است، در این رنگ آمیزی لنفوسیت ها سلول های کوچکی خواهند بود که واکنش نکرده و کمی پراکنده هستند، لنفوسیت های بزرگ آتپیک، بلاست ها و پلاسماسل های همگی از سلول های بزرگ که واکنشی نمی کنند به شمار خواهند رفت، نوتروفیل ها بزرگ ترین سلول هایی خواهند بود که واکنش قوی از نوع پراکسیداز به نمایش می گذارند، ائوزینوفیل هم این چنین هستند اما از نوتروفیل ها کوچک ترند. مونوسیت ها واکنشگری کمتری از نوتروفیل ها و ائوزینوفیل ها داشته و اندازه ای بین نوتروفیل های ائوزینوفیل های خواهند داشت، از این رو نوتروفیل ها بهتر از دیگر سلول ها، در این شیوه شناسایی میشوند. برای شمارش بازوفیل ها از آن رو که چنین توانی ندارند از تکنیک های الگوی لوبولاسیون هسته ای بهره برده می شود. در این تکنیک ها سلول ها به طور هدفمند لیز شده و یک سلول هدف لکوسیتی سالم می ماند تا الگوی هسته آن بررسی گردد.

چون بازوفیل ها در برابر لیز کمتر آسیب پذیرند، این شگرد برای آنها انجام پذیرتر است. از این شیوه می توان برای شناسایی بلاست ها که نمود کمتری از لنفوسیت های بالغ دارند، تعیین نسبت تک هسته ای ها و چند هسته ای ها، گلبول های قرمز که توانایی پراکسیداز متوسطی دارند و بررسی لوسمی ها، سندروم های میلوبلاستیک، التهاب و همچنین عفونت های حاد و مزمن بهره جست. با این وجود برای شمارش سلول ها تنها می توان داده های قابل پذیرشی درباره نوتروفیل ها، مونوسیت ها و لنفوسیت ها فراهم آورد. چرا که با تکنیک های رایج تنها سیتوپلاسم این سه سلول را می توان چروکیده نمود و پیرامون هسته پیچاند و بسته به ویژگی های ریخت شناسی هسته و ویژگی گرانول ها، سلول های بزرگ (نوتروفیل

^۱-Flowcytometry

ها)، سلول های متوسط (مونوسیت ها) و سلول های کوچک (لنفوسیت ها) را بازشناخت. نیاز به شناخت و به دست آوردن داده های دقیق تر و هرچه بیشتر از گلبول های سفید دانش هماتولوژی را به سمت گسترش، بهبود و بنیان گذاری روش هایی کشانده است که آنالیز تفریقی گلبول های سفید گوناگون را در کنار به کارگیری شیوه های مستقیم و یا ترکیب آنها با شگردهای ابزاری، نیمه خودکار یا تمام خودکار انجام می دهد. ولی بررسی گسترش خون همچنان در شناسائی، تشخیص و گردآوری داده ها کمک کننده، مهم ترین نقش را در هر آزمایشگاه دارد و به عنوان استاندارد طلایی^۱ مطرح است. از این رو بایستی بررسی های ریخت شناسی با شگردهای آشکار سازنده ای که نمای ریخت شناسی تفریقی قابل اطمینانی را فراهم می آورد همراه گردد تا مشاهده گر با آسانی و درستی هرچه بیشتر هدف را یافته، کمتر دچار اشتباه شده و همه الگوهای فراتر از لکوسیت های پنج گانه را دریابد. بایست با سلول هایی که از الگوهای تعریف شده پیروی نمی نمایند یا به خوبی رنگ نپذیرفته اند بسیار محتاطانه برخورد نمود و بایست ناهنجاری ها و نابسامانی های آسیب شناختی را بخصوص زمانی که لکوسیت های بافت های خونساز بررسی می شوند را در یاد داشت.

۵-۲- بررسی سیتوشیمیائی :

رنگ آمیزی های سیتوشیمیائی برای شناسایی لکوسیت های بهنجار و نابهنجار، گروه بندی لکوسیتها، دودمان شناسی لکوسیتها و پاتولوژی لکوسیتها همچون دسته بندی لوسمی های حاد بسیار سودمند است و شناسائی درست لوسمی های میلوئید و لنفوئید را شذنی می کند. رنگ آمیزی های سیتوشیمیائی برای بررسی گسترش خون محیطی، مغز استخوان، غده های لنفاوی و تکه برداری دیگر اندامها نیز بکار برده می شود (۳۴، ۲۸، ۲۵، ۵۱، ۵۴).

۵-۲-۱- میلوپراکسیداز^۲ (PER) :

این رنگ آمیزی برای شناسایی سلولهای میلوئید، گرانول های اولیه نوتروفیل و گرانول های ثانویه ائوزینوفیل و مونوسیتها بکار می رود. لنفوسیت ها و گلبول های قرمز هسته دار فاقد آنزیم میلوپراکسیداز هستند. گرانول های لیزوزومی مونوسیت ها به طور ضعیف مثبت هستند. واکنش رنگ به اکسیداسیون بنزیدین به وسیله پراکسید هیدروژن وابسته است و چون بنزیدین سرطان زائی دارد، مواد جایگزینی همچون

^۱- Golden standard

^۲- Myeloperoxidase

۳- آمینو - ۹- اتیل کاربازول یا ۴ - کلرو ۱- نفتول بکار می روند که از توسط میلوپراکسیداز اکسید شده و رنگ قهوه ای یا خاکستری - سیاه در سلول های دارای میلوپراکسیداز ته نشین می شود .
آنزیم میلوپراکسیداز به نور حساس است و گسترش باید زود رنگ شده یا دور از نور نگهداری شود .
فعالیت آنزیم در سلول ها با گذشت زمان کم می شود، بنابراین رنگ آمیزی نباید بیش از سه هفته طول بکشد میلوپراکسیداز به دما و متانول حساس است (۲۸ ، ۳۴) .

۵-۲-۲- سودان بلک بی^۱ (SBB) :

سودان بلک بی ، فسفولیپیدها و سایر لیپیدهای درون سلول ، چربی های طبیعی و استرول های درون نوتروفیل ها ، ائوزینوفیل ها و گهگاه مونوسیت هارا رنگ می کند. الگوی رنگ آمیزی شبیه واکنش میلوپراکسیداز بوده و همراه با رنگ پذیری مثبت سلول های گرانولوسیتی و ائوزینوفیل ها، واکنش ضعیف مونوسیت ها و عدم رنگ آمیزی لنفوسیت است . هرچند گاهی بعضی واکنش های مثبت در گرانول های آروزیلی لنفوبلاست ها دیده می شود. برتری سودان بلک بی نسبت به میلوپراکسیداز این است که با سودان بلک بی می توان گسترش های کهنه تر را رنگ کرد چون در اثر زمان کمتر کاهش می یابد و مواد سودان دوست در سلولها در برابر گرما و نگهداری پایداریستند (۲۸ ، ۳۴) .

۵-۲-۳- استراز اختصاصی^۲ (نفتول AS - D کلرواستات^۳) (CAE) :

رنگ آمیزی استراز اختصاصی که Leder stain هم نامیده می شود به وسیله گروهی از آنزیمها ایجاد می شود . این واکنش بیشتر برای شناسائی سلول های رده گرانولوسیتی به کار می رود . واکنش استراز اختصاصی از پرومیلوسیت تا سلولهای بالغ قوی تر می شود و در میلوبلاست ها واکنش ضعیفی دیده می شود . این روش برای رنگ کردن لنفوسیت ها و مونوسیت به کار می رود. به دلیل پایداری آنزیماتیک در تثبیت بافتها با فرمالین این رنگ به طور وسیع برای شناسائی گرانولوسیت های ماست سل در برشهایبافتی استفاده می شود، بنابراین برای شناسائی تومورهای میلوئید extramedullary (مثل کلروما^۴ و سارکومای گرانولوسیتی^۵) و بلاست های میلوئیدی که در بافت یافت می شوند سودمند است.

^۱ - Sudon Black B

^۲ - Specific esterase

^۳ - Naphthol As- D chloroacetate

^۴ - Chloroma

^۵ - Granulocytic sarcoma

واکنش آنزیمی در روند استراز اختصاصی شامل کیموتریپسین^۱ و الاستاز^۲ است. این آنزیم ها در سلول، ماده نفتول AS - D کلرواستات را هیدرولیز می کنند سپس در نتیجه پیوستن نمک دیازونیوم مجموعه به صورت ماده قرمز - صورتی روشن در جایگاه فعالیت آنزیم رسوب می کند. فعالیت آنزیم به وسیله جیوه، محلول های اسیدی، گرما و ید مهار می شود و ممکن است نتایج منفی کاذب بدهد (۲۸، ۳۴).

۵-۲-۴- استراز غیر اختصاصی^۳ (الفا نفتیل بوتیرات استراز^۴ یا الفا نفتیل استات استراز^۵) α NAE یا α (NBE):

استرازهای غیر اختصاصی گروهی از آنزیمها هستند که توانایی هیدرولیز کردن استرها را دارند و ماده نفتول آزاد شده با رنگ باند می شود به همین دلیل به آنها استراز غیر اختصاصی گفته می شود. بسیاری از استراز ها برای سلول اختصاصی هستند. مونوسیتها، گرانولوسیتها و زیر مجموعه لنفوسیتها واکنش پذیری دارند. الگوی گرانولی قرمز تا صورتی و پراکنده در مونوسیتها دیده می شود. هیستوسیتها کمی شدید تر رنگ می گیرند و واکنش کانونی یا منتشر در لنفوسیتهای T دیده می شود. فعالیت استراز غیر اختصاصی در مونوسیتها با اضافه کردن فلورید سدیم در ماده انکوباسیون مهار می شود ولی لنفوسیتهای T مقاوم هستند. تفاوت در مهار شدن به محل آنزیم در سلولها بستگی دارد بطور مثال آلفانفتیل استات و آلفا نفتیل بوتیرات در مونوسیتها در غشاپلاسمایی هستند ولی در لنفوسیتها در اندامک های درون سلولی قرار دارند. آنزیمهایی که محل آنها در درون سلول است محافظت شده تر هستند. فعالیت استرازها ناپایدار است و به گرما، ثابت کننده ها و نگهداری حساس هستند. رنگ آلفا نفتیل بوتیرات از رنگ آلفا نفتیل استات ویژه تر است اگرچه حساسیت آن کمتر است. رنگ آمیزی ناهمسان با استرازهای متفاوت را در مگاکاریوبلاست ها می توان دید که با آلفا نفتیل بوتیرات رنگ نمی شود اما با آلفا نفتیل استات استراز رنگ می گیرند. اختصاصی بودن سلول برای آلفا نفتیل استات می تواند با تغییر pH محیط تغییر کند. مونوسیتها بهترین رنگ پذیری را در محیط اسیدی دارند هر چند هم گرانوسیتها و هم مونوسیتها می توانند فعالیت آنزیمی را با همان مواد در محیط خنثی نیز نشان دهند. لنفوسیتها فقط در محیط اسیدی با انکوباسیون طولانی آشکار می شوند. لنفوسیتهای T با الگوی رنگ پذیری کانونی در انسانها، سگها و جوجه ها شناسایی می شوند (۲۸، ۳۴).

¹ - Chymotrypsin

² - Elastase

³ - Non Specific esterase

⁴ - α - Naphthyl butyrate

⁵ - α - Naphthyl acetate

۵-۲-۵- فسفاتاز قلیائی لکوسیتی^۱ (LAP) :

فعالیت فسفاتاز قلیائی در سیتوپلاسم نوتروفیل ها، استئوبلاست ها، سلول های اندوتلیال عروق و برخی لنفوسیت ها دیده می شود. سطح فسفاتاز قلیائی نوتروفیل های خون محیطی با اندازه فسفاتاز قلیائی لکوسیتی (LAP) سنجیده می شود.

در این روش نفتول AS - BI فسفات با کمک یک آنزیم با نمک فست ویولت بی^۲ ترکیب می شود و واکنش قرمز درخشان تولید کرده که نوتروفیل ها را پدیدار می کند. مقدار LAP به وسیله اندازه گیری رنگ پذیری از صفر تا چهار مثبت در صد عدد نوتروفیل یا باند سنجیده می شود.

در بعضی سندروم های میلودیسپلاستیک مقدار LAP کاهش می یابد. واکنش لکوموئید در پاسخ به عفونت و سایر اختلالات میلوپرولیفراتیو (میلوفیروز با متاپلازی میلوئید و پلی سایتمی ورا^۳) رخ می دهد و مقدار LAP افزایش یافته دارد. در این موارد فعالیت فسفاتاز قلیایی در نمونه هائی که با ضد انعقاد EDTA گرفته شده سریعاً کاهش می یابد. آزمایش بهتر است بر گسترش های خونی مویرگی تازه یا خون دارای ضد انعقاد هپارین تا ۴۸ ساعت پس از گردآوری نمونه انجام شود (۲۸، ۳۴).

۵-۲-۶- اسیدفسفاتاز^۴ (ACP) :

اسیدفسفاتاز ها مجموعه ای از آنزیمها هستند که استر های فسفات را در محیط اسیدی هیدرولیز می کنند. ایزو آنزیمهای لکوسیتی و اریتروسیتی برای تمایز سلولها اختصاصی هستند. بسیاری از سلولها با اسید فسفاتاز واکنش می دهند که شامل لنفوسیتها، مونوسیت ها، هیستوسیت ها، گرانولوسیت ها بخصوص ائوزینوفیل ها، پلاکتها، مگاکاریوسیت ها، پلاسماسل ها و پیش سازهای اریتروئیدی است. واکنش در مونوسیت ها الگوی پراکنده ای را ایجاد می کند و در هیستوسیت ها شدیدتر است. واکنش تک کانونی یا منتشر در دستگاه گلژی لنفوسیت های T ایجاد می شود. اسید فسفاتاز پایدار به تارتارات ایزوآنزیمی از اسید فسفاتاز است که به فراوانی در سلول های موئی در لوسمی ها و استئوکلاست ها یافت می شود. روش های مختلف اندازه گیری فعالیت اسید فسفاتاز پایدار به تارتارات در دسترس هستند اما استفاده از جفت شدن نفتول AS - BI فسفریک اسید با فست گارنت^۵ در میان این روش ها پذیرفتنی و انجام شدنی است.

^۱ - Leukocyte alkaline phosphatase

^۲ - fast violet B

^۳ - Vera polycytemic

^۴ - Acid phosphatase

^۵ - Fast garnet

واکنش پذیری اسید فسفاتاز مثبت در برخی از لنفوسیت های T، ماکروفاژها و برخی از هیستوسیت ها دیده می شود. همه انواع اسید فسفاتاز به آماده سازی مقاطع بافتی و گرما حساس هستند و بهتر است روی نمونه تازه انجام شوند (۲۸ ، ۳۴).

۵-۲-۷- پرئودیک اسید شیف^۱ (PAS) :

در رنگ آمیزی پرئودیک اسید شیف کربوهیدراتها اکسیده شده و به آلدئید ها تبدیل می شوند سپس به وسیله ماده شیف فعال می شود و یک محصول رنگی تولید می کند که قرمز درخشان است و می تواند کانونی ، پراکنده یا گرانولی باشد . بسته به گونه جانور واکنش مثبت با PAS ممکن است در بسیاری از سلولها مثل نوتروفیل ها ، هتروفیل ها ، ائوزینوفیل ها ، بازوفیل ها ، مونوسیت ها ، لنفوسیت ها ، پلاکت ها ، ترومبوسیت ها و اریتروسیت ها دیده شود . رنگ پذیری PAS بلاست ها هم در لوسمی لنفوبلاستیک حاد و هم لوسمی میلوژنوز حاد دیده می شود. موادی که رنگ می گیرند شامل گلیکوپروتئینها ، موکوپروتئین ها ، گلیکولپیدها و کربوهیدراتهای با وزن مولکولی بالا هستند و در سلولهای خونی ماده ای که آشکار می شود گلیکوژن است (۲۸ ، ۳۴).

۵-۲-۸- تولوئیدین بلو^۲ :

تولوئیدین بلو، اختصاصاً بازوفیل ها و مست سل ها را به وسیله واکنش با اسید موکوپلی ساکاریدها در گرانول های سلول ها و تشکیل مجموعه متاکروماتیک مشخص و رنگ قرمز ارغوانی ایجاد می کند . مست سل ها یا بازوفیل های بدخیم سطوح پائینی از اسید موکوپلی ساکاریدها را دارند و با این رنگ واکنش نمی دهد. بازوفیل ها تنها در تولوئیدین بلوی اسیدی رنگ می گیرند (۲۸ ، ۳۴).

۵-۲-۹- بتاگلوکورونیداز^۳ (β G) :

آنزیمی هیدرولیتیک با الگوی واکنش پذیری مشابه استرازاها است. β G مواد را هیدرولیز می کند تا ترکیب نفتول آزاد شود و در مرحله بعد به یک ترکیب رنگی باند شود. فعالیت آنزیماتیک در لنفوسیت های خون، مونوسیت ها و گرانولوسیت ها آشکار می شود. هم مونوسیت ها و هم نوتروفیل ها واکنش پذیری سیتوپلاسمی ضعیف پراکنده دارند اگرچه لنفوسیت های T واکنش کانونی یا گرانولی جداگانه ایجاد می کند.

¹- Periodic acid schiff

²- Toluidine Blue

³- β - glucoronidase

رنگ آمیزی سیتوشیمیائی کم هزینه و روشی راحت برای شناسائی اجزای شیمیائی سلول های خونی است. روند این رنگ آمیزی ها به ویژه برای دسته بندی انواع سلول های ناشناس دسته وسیعی از گونه های حیوانات شامل پرندگان، خزندگان، دوزیستان، ماهی ها و بی مهرگان مفید است (۳۴ ، ۲۸).

۶- یافته ها و ویژگی های سیتوشیمیائی لکوسیت ها :

روش های رنگ آمیزی سیتوشیمیائی شامل استفاده از رنگ آمیزی ترکیبات خاص سلولی مثل لیپیدها، کربوهیدرات ها و آنزیم ها در بررسی های میکروسکوپی است. با این رنگ ها می توان انواع سلول های طبیعی را تشخیص داد و دودمان سلول های بلاست که به خوبی تفریق نمی شود را شناسائی کرد. رنگ آمیزی های سیتوشیمیائی را می توان برای بافت های همولنفاتیک (خون، مغز استخوان، غدد لنفاوی، طحال و تیموس) و یا کبد استفاده کرد (۳۱).

اگرچه رنگ آمیزی های سیتوشیمیائی برای سلول های گونه های مختلف قابل اجرا است اما جالب توجه است که زمان انکوباسیون، الگوی رنگ پذیری و حضور مواد بین گونه های پرندگان، خزندگان و ماهیان ممکن است تفاوت داشته باشد.

۶-۱- ویژگی های سیتوشیمیائی لکوسیت های جانوران :

۶-۱-۱- ویژگی های سیتوشیمیائی نوتروفیل ها و هتروفیل ها :

گرانول های لیزوزومال اولیه یا آزروفیلیک حاوی آنزیم میلوپراکسیداز هستند، فعالیت پراکسیداز به آسانی از مرحله پرومیلوسیت تا سلول های بالغ آشکار می شود. در بررسی با میکروسکوپ الکترونی فعالیت پراکسیداز در غشاء هسته، شبکه آندوپلاسمی خشن و دستگاه گلژی میلوبلاست ها نمایان می گردد. واکنش پراکسیداز عموماً در هتروفیل های خرگوش، بعضی پرندگان و خزندگان وجود ندارد. نوتروفیل های با عملکرد ائوزینوفیلیک مانند سلول های گاو دریائی دارای میلوپراکسیداز هستند و به شدت رنگ می گیرند (۲۸).

گرانول های اختصاصی یا ثانویه حاوی لیپید با رنگ سودان بلک بی رنگ می گیرند و رنگ پذیری با این رنگ به مقدار کمتری در گرانول های اولیه هم دیده می شود. به این دلیل که هم گرانول های اولیه و هم ثانویه رنگ می گیرند همه مراحل بلوغ نوتروفیل تفکیک می شود. گرانول های نوتروفیلیک اولیه و ثانویه حاوی کلرواستات استراز هستند و با ایجاد واکنش متوسط تا شدید همه مراحل بلوغ نوتروفیل را شناسائی می کند.

فسفاتازقلیایی لکوسیتی به فراوانی در گرانول های ثانویه نوتروفیل بسیاری از گونه ها همچون انسان ها، اسب ها، خرگوش ها و نشخوارکنندگان یافت شده است ولی در سگ و گربه دیده نشده است (۲۸). نوتروفیل های اسب و بز که برای بررسی فعالیت استراز غیر اختصاصی رنگ آمیزی شده اند واکنش پذیری متغیری را نشان می دهند و در گونه های زیادی غیرفعال هستند (۲۸). فعالیت اسید فسفاتاز در گرانول های اولیه نوتروفیل ها وجود دارد و در نوتروفیل های نابالغ بیشتر از سلول باند یا بالغ می باشد.

۶-۱-۲- ویژگی های سیتوشیمیایی ائوزینوفیل ها :

پراکسیدازی که در ائوزینوفیل ها وجود دارد با پراکسیدازی که در نوتروفیل ها و مگاکاریوسیت ها دیده می شود از نظر ساختمان و بیوشیمی متفاوت است. این آنزیم در ماده زمینه ای گرانول های ائوزینوفیلیک بزرگ دیده می شود اما در هسته کریستالوئیدی وجود ندارد. برخلاف ائوزینوفیل های بسیاری از گونه ها، ائوزینوفیل های گربه نه با پراکسیداز رنگ می گیرد و نه با سودان بلک بی. در پرندگان و خزندگان واکنش سودان بلک بی و پراکسیداز در ائوزینوفیل ها دیده می شود. به طور کلی ائوزینوفیل ها با کلرواستات استراز رنگ نمی گیرند (۲۸).

فعالیت استراز غیر اختصاصی در ائوزینوفیل های گربه سانان و سگ سانان وجود ندارد اما گهگاه در ائوزینوفیل های اسب ها و نشخوارکنندگان یافت می شود. ائوزینوفیل ها به خصوص در گربه به شدت با اسید فسفاتاز در قسمت درون گرانولی رنگ می گیرند. فعالیت فسفاتاز قلیائی لکوسیتی به صورت درون سلولی بین گرانول های اختصاصی ائوزینوفیل ها یافت می شود. شدیدترین واکنش پذیری در ائوزینوفیل های اسب رخ می دهد. به کار بردن رنگ های اختصاصی ائوزینوفیل ها مثل لونا^۱ و لوکسول فست بلو^۲ برای تشخیص کارآمدتر است (۲۸).

۶-۱-۳- ویژگی های سیتوشیمیایی بازوفیل ها :

بازوفیل ها در واکنش با پراکسیداز و سودان بلک بی منفی هستند. بازوفیل های گربه ممکن است گهگاه با فسفاتاز قلیائی لکوسیتی واکنش مثبت بدهد. رنگ کلرواستات استراز واکنش مثبت متوسطی در بازوفیل های گربه سانان و سگ سانان نشان می دهد. ، بازوفیل های سگ و گربه، اسب و گاو در واکنش با استراز غیر

^۱ - Luna.

^۲ - Luxol fast blue.

اختصاصی منفی هستند. واکنش اسید فسفاتاز گاهی در بازوفیل های سگ و گربه دیده می شود (۲۸).

۶-۱-۴- ویژگی های سیتوشیمیایی مونوسیت ها :

مونوسیت های بیشتر گونه ها با پراکسیداز و سودان بلک بی واکنش مثبت ضعیف و پراکنده دارند. فعالیت پراکسیداز زمانی که نیترات مس برای شدت بخشیدن واکنش آنزیمی در لیزوزوم ها استفاده می شود بیشتر قابل دیدن است. به طور کلی مونوسیت ها فعالیت کلرواستات استراز ندارند هرچند واکنش مثبت کمی در مونوسیت های گاو، اسب، بز و گوسفند دیده می شود. استرازهای غیر اختصاصی در سلول های منشاء مونوسیت وجود دارد که در نتیجه آن واکنش پذیری منتشر تا کمی گرانولار که در درون ماکروفاژها با شدت بیشتری رنگ پذیرند، دیده می شود.

فعالیت استراز غیر اختصاصی با فلورید سدیم مهار می شود چون محل آنزیم در غشاء پلاسمایی است. واکنش اسید فسفاتاز مانند آنچه در استراز غیر اختصاصی دیده می شود پراکنده است. واکنش پذیری اسید فسفاتاز به طور متوسطی در مونوسیت ها وجود دارد و با بلوغ شدیدتر می شود تا به ماکروفاژها برسد (۲۸).

۶-۱-۵- ویژگی های سیتوشیمیایی لنفوسیت ها :

لنفوسیت ها با بسیاری از روش های سیتوشیمیایی که برای شناسایی سلول های گرانولوسیتی و مونوسیتی به کار می روند واکنش نمی کنند. موارد نادری از لنفوسیت های انسان با واکوئول های پر از چربی با پراکسیداز واکنش مثبت داده اند. فعالیت فسفاتاز قلیائی در لنفوسیت های T غدد لنفاوی سگ ممکن است دیده شود. واکنش کلرواستات استراز در لنفوسیت ها نادر است اما رنگ پذیری ضعیفی در لنفوسیت های گاو و اسب گزارش شده است. استراز غیر اختصاصی در اندامک های درون سلولی لنفوسیت های انسان، سگ، گربه، اسب، گاو، گوسفند و جوجه ماکیان دیده شده است. سلول های سازگار با سلول های کشنده طبیعی (NK) رنگ پذیری ضعیف کانونی را با استراز غیر اختصاصی و پریودیک اسید شیف نشان می دهند. واکنش پریودیک اسید شیف ضعیفی در لنفوسیت های گاو، سگ، اسب و گوسفند دیده شده است. واکنش اسید فسفاتاز مثبت در سلول های کشنده طبیعی سگ مشاهده شده است (۲۸).

۶-۲- یافته ها و ویژگی های سیتوشیمیایی لکوسیت های ماهیان :

لوئیس باربر و وسترم (۱۹۷۷) با بررسی ۵۸ گونه ماهی که اغلب ماهی استخوانی بودند ، دریافتند گرانولوسیت ها دارای گرانول های پرپروتیک اسید شیف مثبت در ۳۰ گونه هستند (۱۳).

گراوینی و مارتلی (۱۹۸۱) در بررسی ماهی طلایی (*Carrasssius auratu*) بیان کردند که گرانول های نوتروفیل های جوان و بخشی از ائوزینوفیل ها در واکنش با فسفاتاز قلیائی مثبت بوده و واکنش مثبت باپراکسیداز را در گرانول های نوتروفیل های بالغ و بخشی از ائوزینوفیل ها مشاهده کردند. بازوفیل ها در این واکنش ها منفی بودند (۳۲). این محققین در بررسی گربه ماهی (*Ictalurus melas*) نشان دادند که دو رده نوتروفیل در خون محیطی این ماهیان یافت می شود و فعالیت فسفاتاز قلیائی فقط در نوتروفیل های واکوئول دار و پراکسیداز فقط در نوتروفیل های تیپیک ظاهر می شود (۳۳).

در سال ۱۹۸۶ هاین و وین در بررسی گرانولوسیت های الاسموبرانش ها بیان کردند گرانولوسیت های ائوزینوفیلیک و نوتروفیلیک در واکنش با اسید فسفاتاز، استراز و پرپروتیک اسید شیف متغیرند اما در واکنش با استراز غیر اختصاصی گرانولوسیت های نوتروفیلیک واکنش شدیدی دارند. ائوزینوفیل ها و برخی نوتروفیل ها واکنش پراکسیداز ضعیفی دارند . گرانولوسیت های نوتروفیلیک واکنشی متوسط تا شدید با استیل ال تیروزین آلفا نفتیل استراز^۱ و واکنشی ضعیف و ناهماهنگ با توزیل ال لیزین آلفا نفتیل استراز^۲ در *Palatias licha* و *Squalus acanthia* نشان دادند (۳۹).

استوسکوف (۲۰۰۰) بیان کرد که هم ائوزینوفیل ها و هم هتروفیل های الاسموبرانش ها با رنگ اسید فسفاتاز و پرپروتیک اسید شیف واکنش مثبت دارند (۸۶). گیرامیلدی و همکاران (۱۹۸۳) یافتند که واکنش گرانولوسیت های هتروفیلیک با پرپروتیک اسید شیف منفی، با آلی استراز^۳ مثبت و با آدنوزین تری فسفاتاز (ATP_{ase}) مثبت ضعیف است در حالی که گرانولوسیت های ائوزینوفیلیک که در ماده زمینه ای پلی ساکاریدهای طبیعی دارند به شدت با آدنوزین تری فسفاتاز واکنش منفی و با اسید فسفاتاز واکنش مثبت نشان می دهند . استوسکوف (۲۰۰۰) ذکر کرد در خون بعضی از گونه های الاسموبرانش ها سلول هائی دیده می شود که از نظر ظاهر بسیار شبیه گرانولوسیت ها بوده اما گرانول های سیتوپلاسمی ندارند و برای او روشن نشد که آیا این سلول ها گرانول ها را از دست داده اند یا گرانول های آنها به خوبی تشکیل نشده یا اینها نوعی سلول جداگانه هستند. هیچ بررسی سیتوشیمیائی برای روشن شدن این مسئله انجام نشده است. این سلول ها در شمارش تفریقی با هتروفیل ها دسته بندی می شوند (۸۶).

¹ - Acetyl - L - tyrosine - α - naphthyl

² - Tosyl - L - lysine - α - naphthyl esterase

³ - Aliesterase

لنفوسیت ها، مونوسیت ها و ترومبوسیت های الاسموبرانش ها با رنگ پرئودیک اسید شیف واکنش مثبت ضعیف نشان می دهند. لنفوسیت ها گرانول های آلی استراز مثبت دارند و مونوسیت ها گهگاه گرانول های کوچک دارند که در واکنش با پرئودیک اسید شیف مثبت و با اسید فسفاتاز و آلی استراز ضعیف هستند (۸۶).

هاین و وین (۱۹۸۸) در بررسی سیتوشیمیائی گرانولوسیت های تاس ماهی پوزه کوتاه (*Acipenser brevirostrum*) بیان کردند که گرانول های رشته ای نوتروفیل با رنگ های فسفاتاز قلیائی، فسفاتاز اسیدی، آلفا نفتیل استات استراز، استیل ال تیروزین آلفا نفتیل استراز و پرئودیک اسید شیف واکنش مثبت و گرانول های بزرگ با همه آنزیم ها بجز پرئودیک اسید شیف واکنش منفی نشان می دهند. ائوزینوفیل ها گرانول های مقاوم به پراکسیداز آمینو تریازول و سیانید آزید^۱ دارند و در واکنش با اسید فسفاتاز، آلفا نفتیل استات استراز، توزیل ال لیزین آلفا نفتیل استراز و لوکسول فست بلو مثبت می باشند (۳۹).

زینکل و همکاران (۱۹۹۱) در بررسی سیتوشیمیائی شش گونه ماهی از جمله تاس ماهی سفید (*Acipenser transmontanus*) بیان کردند الگوی رنگ پذیری مثبت و منفی گرانول های سیتوپلاسمیک با فسفاتاز قلیائی شبیه ائوزینوفیل های اسب است (۱۰۴).

پالیکوا و همکاران (۱۹۹۹) با بررسی مورفولوژیک لکوسیت های *Acipenser baerii* و *Acipenser stellatus* و *Huso huso* گرانولوسیت های ائوزینوفیلیک و نوتروفیلیک، لنفوسیت و ترمبوسیت را دید ولی بازوفیلی ندید. وی در شمارش تفریقی بیان کرد لنفوسیت ها ۷۳/۵-۶۸/۰ درصد، گرانولوسیت های نوتروفیلیک ۲۵/۱-۲۱/۸ درصد، گرانولوسیت های ائوزینوفیلیک ۴/۶-۳ درصد و سایر انواع سلول ها حدود ۲-۷/۰ درصد هستند (۵۵).

تریپاتی و همکاران (۲۰۰۴) در بررسی سیتوشیمیائی *Cyprinus carpio* بیان کردند که بازوفیل ها با رنگ پرئودیک اسید شیف واکنش مثبت دارند. فعالیت نفتول AS - D کلرواستات استراز فقط در ائوزینوفیل ها دیده شده و این سلولها با آلفا نفتیل بوتیرات استراز و اسید فسفاتاز واکنش مثبت نشان می دهند (۹۰).

تاواریس (۲۰۰۵) در بررسی سیتوشیمیائی *Hoplosternum littorale* که از ماهیان استخوانی امریکای جنوبی به شمار می رود بیان کرد لنفوسیت ها با پرئودیک اسید شیف، پراکسیداز و استراز غیر اختصاصی واکنش منفی نشان می دهند. مونوسیت ها فعالیت استراز غیر اختصاصی مثبت دارند. نوتروفیل ها گرانول های پرئودیک اسید شیف مثبت داشته و واکنش آنها با پراکسیداز ضعیف می باشد. هتروفیل ها

^۱ - Xyanide – azide and aminotrizole – resistant peroxidase.

گرانول های با واکنش پرئودیک اسید شیف مثبت دارند . ائوزینوفیل ها در همه رنگ آمیزی های سیتوشیمیائی منفی هستند (۹۲) .

تاوارس (۲۰۰۶) در بررسی لکوسیت های *Astronotus ocellatus* ، *Aristichthys nobilis* و *Asyanax bimaculatus* با رنگ آمیزی های سیتوشیمیائی بیان کرد که ائوزینوفیل ها تنها در *A. ocellatus* و *A. nobilis* دیده شده که با رنگ پرئودیک اسید شیف واکنش رنگ پذیری شدیدی نشان می دهند. رنگ آمیزی پراکسیداز در نوتروفیل های *A. ocellatus* و *H. malabaricus* و *A. bimaculatus* دیده شده ولی در *A. nobilis* دیده نمی شود. مونوسیت های *A. ocellatus* ، *H. malabaricus* و *A. bimaculatus* در رنگ آمیزی استراز غیر اختصاصی واکنش مثبت نشان داده ولی مونوسیت های *A. nobilis* رنگ نمی گیرند (۹۴) .

تاوارس (۲۰۰۷) در بررسی سیتوشیمیائی گربه ماهی (*Ictalurus punctatus*) بیان کرد نوتروفیل ها با پراکسیداز و پرئودیک اسید شیف واکنش مثبت، مونوسیت ها با استراز غیر اختصاصی واکنش مثبت و بازوفیل ها با رنگ تولوئیدن بلوواکنش مثبت نشان می دهند (۹۵) .

تاوارس و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی سیتوشیمیائی *Colossoma macropomum* و *Prochilodus lineatus* بیان کردند که در خون محیطی *C. macropomum* ترمبوسیت ، نوتروفیل ، لنفوسیت ، ائوزینوفیل ، مونوسیت دیده شده اند . همچنین سلول هائی وجود دارد که گرانول های مثبت با پرئودیک اسید شیف دارند. این سلول ها، سلول هائی هستند با سیتوپلاسم دارای گرانول های فراوان که هتروفیل ها را به یاد می آورند ولی با هیچکدام از رنگ های رومانوفسکی رنگ نمی گیرند (۹۶) و در *P. lineatus* فقط ترمبوسیت ، نوتروفیل ، لنفوسیت و ائوزینوفیل دیده شدند. ترمبوسیت ها در هر دو گونه پراکسیداز و استراز غیر اختصاصی منفی و پرئودیک اسید شیف مثبت هستند. واکنش با فسفاتاز قلیائی در *C. macropomum* منفی ولی در *P. lineatus* مثبت می باشد (۹۶) .

شیگدار و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی سیتوشیمیائی لکوسیت های روغن ماهی (Murray cod) بیان کردند که هتروفیل های این ماهی با پراکسیداز واکنش مثبت داشته در حالی که بازوفیل ها، لنفوسیت ها، مونوسیت ها و ترمبوسیت ها واکنش منفی نشان می دهند. واکنش با اسید فسفاتاز در همه لکوسیت ها دیده شده ولی واکنش با فسفاتاز قلیائی فقط در هتروفیل ها و گروهی از لنفوسیت ها دیده می شود. واکنش با بتا گلوکورنیداز را نیز در همه سلول ها مشاهده کردند اگرچه در هتروفیل ها واکنش ضعیف وجود داشت . جالب آنکه همه لکوسیت های روغن ماهی به جز مونوسیت ها با نفتول AS – D کلرواستات استراز واکنش مثبت نشان دادند در حالی که در رنگ آمیزی نفتیل استات

استراز هتروفیل ها، لنفوسیت ها، مونوسیت ها و بازوفیل ها واکنش مثبت نشان دادند . واکنش مثبت با آلفا نفتیل بوتیرات استراز در هیچ یک از سلول های این ماهیان دیده نشد (۷۲).
واکنش با سودان بلک بی در هتروفیل های ماهی به شدت مثبت بوده و در گروهی از لنفوسیت ها واکنش مثبت دیده می شود ولی سایر سلول ها واکنش منفی نشان می دهند. در رنگ آمیزی با پرئودیک اسید شیف هتروفیل ، بازوفیل ، ترمبوسیت و گروهی از لنفوسیت ها واکنش مثبت و مونوسیت واکنش منفی نشان می دهند (۷۲).

فصل سوم

مواد و روش کار

۱- مواد و وسایل :

سرنگ ۲ و ۵ سی سی پلی اتیلنی یکبار مصرف استریل، لوله همتوکریت حاوی هپارین، لام شیشه ای، کیت های رنگ آمیزی پراکسیداز، سودان بلک بی، آلفا نفتیل استات استراز، نفتول AS - D کلرواستات استراز، اسید فسفاتاز، پرئودیک اسیدشیف و بتاگلوکورونیداز ساخت شرکت سیگما - آلدریج^۱، محصول آلمان رنگ گیمسا، میکروسکوپ نوری الیمپوس^۲ ساخت ژاپن، میکروسکوپ میکرومتری ساخت شرکت Leica با CCD مدل COHU سیاه سفید و اندازه گیری با نرم افزار Leica Qwin 550، میکروسکوپ عکسبرداری ساخت شرکت الیمپوس با CCD معمولی و بزرگنمایی X ۵۰ با نرم افزار Inter video NSIPV5

۲- روش کار :

۲-۱- نمونه برداری :

با اطلاع از مستندات صید و نگهداری و پرورش ماهیان در پرورشگاه های رسمی و معتبر ماهیان خاویاری برای نمونه گیری با هماهنگی های قبلی به انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان (رشت)، مرکز تکثیر و بازسازی ذخائر ماهیان خاویاری شهید بهشتی (گیلان)، مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری شهید رجایی (مازندران) و مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری شهید مرجانی (گلستان) مراجعه شد. از گونه های تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)، ازون برون (*Acipenser stellatus*)، تاس ماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedtii*)، تاس ماهی شیب (*Acipenser nudiiventris*) و فیل ماهی (*Huso huso*) نمونه برداری صورت گرفت. از ماهیان موجود در مراکز فوق از انگشت قد تا یازده ساله با فواصل یکساله و از هر رده سنی ۱۰ عدد ماهی به صورت اتفاقی و به روش خوشه ای برای خونگیری انتخاب شدند. تنها از ماهیانی خونگیری به عمل آمد که با توجه به کارت های بهداشتی و نشانه های بالینی قابل بررسی در سلامت به سر می بردند. خونگیری از ماهیان انگشت قد زیر یکسال با قطع دم به کمک اسکالپل و استفاده از لوله موئینه آغشته به هپارین و در ماهیان با سنین بالاتر از ورید دمی - شکمی با سرنگ یکبار مصرف بدون استفاده از بیهوشی انجام شد (تصویر شماره ۱).

^۱ Sigma - Aldrich

^۲ - Olympus

۲-۲- آماده سازی نمونه ها و تهیه گسترش خون :

از هر نمونه بلافاصله با لوله هماتوکریت خون برداشته و بر روی لام قرار داده شد و با روش گسترش گوه ای (کشیدن لبه لام) گسترش خون تهیه شد. از هر نمونه خون ۱۰ عدد گسترش خونی تهیه شد. همه لام ها با قلم الماس کدگذاری و به طور مقدماتی با متانل به مدت سی ثانیه ثابت شدند و سپس در جعبه های لام فایل بندی شده و به آزمایشگاه کلینیک تخصصی دام های کوچک، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشگاه علوم تخصصی دامپزشکی تهران منتقل گردیدند. برای بررسی الگوی لکوسیتی نمونه های خون نخست یک لام از هر گروه سنی در هر گونه، به روش گیمسا رنگ آمیزی گردید تا بر اساس داده های ریخت شناسی گلبول های سفید، رنگ پذیری گلبول های سفید در جمعیت ذکر شده مورد بررسی مقدماتی قرار گیرد تا اگر در روش گردآوری نمونه ها و یا در ماهیان نمونه برداری شده اختلالی وجود دارد به طوری که بر روی گلبول های سفید تأثیرگذار باشد، روشن شود. برای بررسی لکوگرام و تشخیص تفریقی سلول های بالغ بر اساس شناسائی کلاسیک ۵ سلولی الگوی گلبول های سفید خون محیطی، رنگ آمیزی های سیتوشیمیائی میلوپراکسیداز، سودان بلک بی، نفتول AS - D کلرواستات استراز، آلفا نفتیل استات استراز، اسید فسفاتاز، پرئودیک اسید شیف و بتا گلوکوروئیداز با استفاده از کیت های تجاری ساخت شرکت سیگما - آلد ریچ انجام شد.

۲-۳- روش های رنگ آمیزی :

۲-۳-۱- روش رنگ آمیزی میلوپراکسیداز :

در این روش ابتدا محلول ثابت سازی با ترکیب کردن پنج میلی لیتر فرمالدئید ۳۷ درصد و ۴۵ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد ساخته شد. گسترش های خونی به مدت ۳۰ ثانیه در این محلول ثابت سازی قرار داده شدند تا ثابت سازی انجام شود، سپس با آب جاری به مدت دو دقیقه شستشو شدند و به مدت ده دقیقه در تاریکی قرار داده شدند تا خشک شوند. پس از آن بافر تریزمال^۱ با $\text{pH} = 6.3$ رقیق شده، با مخلوط کردن یک حجم بافر غلیظ تریزمال ۶/۳ و ۹ حجم آب دیونیزه تهیه شد و در بن ماری قرار داده شد تا دمای آن به ۳۷ درجه سانتیگراد برسد. بلافاصله قبل از استفاده یک ویال ماده پراکسیداز و ۲۰۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسید ۳ درصد به بافر رقیق تریزمال ۶/۳ که قبلاً گرم شده بود اضافه و به خوبی مخلوط شد. هیدروژن پراکسید ۳ درصد با اضافه کردن یک قسمت هیدروژن پراکسید ۳۰٪ به ۹ قسمت محلول بافر نمک فسفات با $\text{pH} = 7.4$ تهیه شد. سپس گسترش های خونی شسته شده و ثابت شده به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی در

^۱ - Trizmal 6.3

این محلول تهیه شده در بن ماری ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. بعد از این مدت گسترش ها به خوبی با آب جاری به مدت ۳۰-۱۵ ثانیه شستشو و در هوا خشک شدند. گسترش ها برای رنگ آمیزی پس زمینه به مدت ۱۰ دقیقه در محلول اسید همتوکسیلین قرار داده شدند و بعد از آن با آب دیونیزه به مدت ۳۰-۱۵ ثانیه کاملاً شستشو شدند و در جریان هوای آزاد خشک شده و آماده بررسی با میکروسکوپ نوری شدند. سلول های هدف برای شناسائی اختصاصی و اندازه گیری های میکرومتری و عکس برداری مورد بررسی قرار گرفتند (۹۱، ۵، ۷۸).

۲-۳-۲- روش رنگ آمیزی سودان بلک بی :

در این روش ابتدا محلول ثابت سازی گلو تار آلدئید ۰.۴٪ در بافر بورات با $\text{pH} = 7.4$ ساخته و در دمای ۸- ۲ درجه سانتیگراد گذاشته و لام ها در این محلول به مدت یک دقیقه قرار داده شدند. لام ها پس از شستشو با آب دیونیزه در رنگ سودان بلک بی به مدت پنج دقیقه غوطه ور و آنگاه چندین بار در اتانل ۷۰ درجه شستشو شده تا رنگ های اضافی پاک گردیده و سپس با آب مقطر پاکسازی انجام گردید. برای رنگ آمیزی پس زمینه، لام ها در محلول همتوکسیلین به مدت پنج دقیقه قرار گرفته و در آخر با آب جاری شستشو انجام شد. لام خشک شده در جریان هوای آزاد آماده بررسی با میکروسکوپ نوری شدند و سلول های هدف برای شناسائی اختصاصی و اندازه گیری های میکرومتری و عکس برداری مورد بررسی قرار گرفتند (۹۱، ۵، ۷۶).

۲-۳-۳- روش رنگ آمیزی نفتول AS - D کلرواستات استراز :

در این روش ابتدا محلول ثابت سازی با ترکیب کردن ۱۸ میلی لیتر محلول سترات و ۲۷ میلی لیتر استن و ۵ میلی لیتر متانل ساخته شد و لام ها یک دقیقه در این محلول قرار داده شدند تا ثابت سازی انجام شود. سپس با آب دیونیزه شستشو شدند و پس از آن محلول تریزمال ۶/۳ با حل کردن یک قسمت بافر غلیظ تریزمال ۶/۳ در ۹ قسمت آب دیونیزه تهیه شد و یک کپسول نمک V کوریتس سریع^۱ و سپس دو میلی لیتر محلول نفتول AS - D کلرواستات به آن اضافه و به مدت ۳۰-۱۵ ثانیه مخلوط شد. همه لام ها در محلول تهیه شده به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند و به مدت ۳ دقیقه با آب دیونیزه شستشو گردیدند. محلول نفتول AS - D کلرواستات با حل کردن یک کپسول نفتول AS - D کلرواستات در دو میلی لیتر دی متیل فرمامید^۲ به دست می آید. برای رنگ آمیزی پس زمینه، لام ها به مدت ۱۰-۵ دقیقه در محلول

^۱ - Fast corinth V salt

^۲ - Dimethyl Formamide

اسید همتوکسیلین قرار گرفته و سپس با آب جاری شستشو و در هوای آزاد خشک شد و سلول های هدف به وسیله میکروسکوپ نوری برای شناسائی اختصاصی و اندازه گیری میکرومتری و عکس برداری بررسی شدند (۹۱ ، ۷۷) .

۲-۳-۴- روش رنگ آمیزی آلفا نفتیل استات استراز :

در این روش ابتدا محلول ثابت سازی با ترکیب کردن ۱۸ میلی لیتر محلول سیترات و ۲۷ میلی لیتر استن و ۵ میلی لیتر متانل ساخته شد و لام ها یک دقیقه در این محلول قرار داده شدند تا ثابت سازی انجام شود . سپس با آب دیونیزه شستشو شدند . پس از آن محلول تریزمال $pH = 7/6$ با حل کردن یک قسمت بافر غلیظ تریزمال ۷/۶ در ۹ قسمت آب دیونیزه تهیه شد و یک کپسول نمک RR آبی سریع^۱ و سپس ۲ میلی لیتر محلول نفتیل استات به آن اضافه و به مدت ۲۰-۱۵ ثانیه مخلوط شد. همه لام ها در محلول تهیه شده به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده و سپس به مدت ۳ دقیقه با آب دیونیزه شستشو شدند. محلول نفتیل استات با حل کردن یک کپسول نفتیل استات^۲ در ۲ میلی لیتر اتیلن گلیکول مونو متیل اتر^۳ به دست می آید. برای رنگ آمیزی پس زمینه، لام ها به مدت ۱۰-۵ دقیقه در محلول همتوکسیلین مایر^۴ قرار گرفته و سپس با آب جاری شستشو و در هوای آزاد خشک شدند . سلول های هدف به وسیله میکروسکوپ نوری برای شناسائی اختصاصی و اندازه گیری های میکرومتری و عکس برداری بررسی شدند (۹۱ ، ۷۷) .

۲-۳-۵- روش رنگ آمیزی اسید فسفاتاز :

در این روش ابتدا محلول ثابت سازی با ترکیب ۲۵ میلی لیتر محلول سیترات، ۶۵ میلی لیتر استن و ۸ میلی لیتر فرمالدئید ۳۷ درصد ساخته شد و لام ها به مدت ۳۰ ثانیه در این محلول غوطه ور شدند تا ثابت سازی انجام شود . سپس با آب دیونیزه شستشو انجام شد. در مرحله بعد در دو لوله ۰/۵ میلی لیتر محلول فست گارنت^۵ GBC و ۰/۵ میلی لیتر محلول نیتريت سدیم ریخته و به مدت ۳۰ ثانیه مخلوط شد. به یک جار، ۴۵ میلی لیتر آب دیونیزه، یک میلی لیتر محلول فست گارنت GBC که قبلاً آماده شده بود، ۰/۵ میلی لیتر محلول نفتول BI - AS فسفات و دو میلی لیتر محلول استات اضافه شد و لام ها به مدت یک ساعت در این جار قرار داده شده و بعد از این مدت با آب دیونیزه شستشو شده و برای رنگ آمیزی

¹ - Fast Blue RR salt

² - Naphthyl acetate

³ - Ethylene Glycol Monomethyl Ether

⁴ - Mayer's hematoxylin

⁵ - Fast Garnet GBC

پس زمینه به مدت دو دقیقه در محلول همتوکسیلین قرار داده شدند. پس از شستشو با آب جاری در هوای آزاد خشک شده و سلول های هدف به وسیله میکروسکوپ نوری برای شناسائی اختصاصی و اندازه گیری های میکرومتری و عکس برداری بررسی شدند (۹۱ ، ۷۳).

۲-۳-۶- روش رنگ آمیزی پریودیک اسید شیف :

در این روش ابتدا محلول ثابت سازی با ترکیب کردن پنج میلی لیتر فرمالدئید با ۴۵ میلی لیتر اتانول ۹۵ درجه تهیه شد و لام ها به مدت یک دقیقه در این محلول قرار گرفتند و ثابت سازی انجام شد. سپس لام ها یک دقیقه با آب جاری شستشو شدند و پس از آن پنج دقیقه در محلول پریودیک اسید قرار گرفتند. لام ها به خوبی با آب مقطر شستشو شدند و ۱۵ دقیقه در ماده شیف قرار گرفتند. در مرحله بعد پنج دقیقه با آب جاری شستشو انجام شد و برای رنگ آمیزی پس زمینه ۹۰ ثانیه در محلول همتوکسیلین قرار گرفتند. لام ها بعد از شستشو با آب جاری در هوای آزاد خشک شده و سلول های هدف به وسیله میکروسکوپ نوری برای شناسائی اختصاصی و اندازه گیری های میکرومتری و عکس برداری بررسی شدند (۹۱ ، ۵ ، ۷۵).

۲-۳-۷- روش رنگ آمیزی بتا گلوکورونیداز :

در این روش ابتدا محلول ثابت سازی با ترکیب کردن ۲۵ میلی لیتر محلول سیترات و ۶۵ میلی لیتر استن و ۸ میلی لیتر فرمالدئید ۳۷ درصد ساخته شد و به دمای ۲۶-۲۳ درجه سانتیگراد رسید. گسترش های خونی به مدت ۳۰ ثانیه در این محلول ثابت سازی قرار داده شدند تا ثابت سازی انجام شود. سپس ۴۵ ثانیه در آب دیونیزه شستشو شدند. بعد از آن لام ها در محلولی که به صورت زیر تهیه شده بود قرار داده شدند :

۰/۵ میلی لیتر محلول قرص نیتريت سدیم (که با حل کردن یک قرص نیتريت سدیم در ۶/۲۵ میلی لیتر آب دیونیزه به دست می آید) با ۰/۵ میلی لیتر محلول پاراروزانیلین^۱ مخلوط شدند و به مدت پنج دقیقه ماندند و سپس به ۳۸ میلی لیتر آب دیونیزه که قبلاً گرم شده و به دمای ۳۷ درجه سانتیگراد رسیده بود اضافه شدند. لام های ثابت سازی شده به مدت ۹۰ دقیقه در این محلول در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به دور از نور قرار داده شدند. بعد از ۹۰ دقیقه لام ها به مدت ۲-۳ دقیقه در آب جاری شستشو شدند و در جریان هوای تازه خشک شدند سپس برای رنگ آمیزی پس زمینه لام ها به مدت ۳ دقیقه در رنگ متیلن بلو قرار داده شدند. رنگ متیلن بلو با مخلوط کردن ۵ میلی لیتر محلول متیلن بلو و ۴۵ میلی لیتر آب دیونیزه تهیه شد.

^۱ - Pararosaniline

بعد از این مدت لام ها به خوبی با آب دیونیزه شستشو شدند و در جریان هوای آزاد خشک شده و سلول های هدف به وسیله میکروسکوپ نوری برای شناسائی اختصاصی و اندازه گیری های میکرومتری و عکس برداری بررسی شدند (۹۱، ۷۴).

۲-۴- بررسی گسترش های رنگ آمیزی شده :

از آن رو که بایستی همه سلول ها و گروه های لکوسیتی بالغ به درستی و بدون اشتباه و با قابلیت تفکیک بسیار زیاد از یکدیگر باز شناخته شوند ، نمای ریخت شناسی گلبول های سفید موجود در گسترش های رنگ آمیزی شده با رنگ های سیتوشیمیائی و الگوی مشاهده شده در رنگ آمیزی رومانوفسکی مورد مقایسه قرار گرفت و الگوی گسترده تری از شناسائی پنج بنیانی گلبول های سفید فراهم شد. گسترش های رنگ آمیزی شده که ویژگی های یک گسترش مناسب را نداشتند. در روند بررسی نمونه ها حذف گردیدند.

۲-۴-۱- شمارش تفریقی

شمارش تفریقی گلبولهای سفید خونی ماهیان خاویاری گونه های بررسی شده گسترش های خونی رنگ شده به روش رومانوفسکی بکار برده شدند . با استفاده از میکروسکوب نوری در محدوده ای از گسترش خونی که توزیع گلبولهای سفید نرمال بود تعداد هر یک از گلبولهای سفید و داده های بدست آمده یادداشت گردید . بدین ترتیب که پس از شمارش بیش از ۲۰۰ سلول نسبت هر یک از گلبولهای سفید خونی به درصد بدست آمد (مراجعه به جدول شماره ۱). درصد نسبی گلبولهای سفید خونی ماهیان بررسی شده برای هر یک از گروههای سنی جداگانه و به روش یاد شده بدست آمد .

۲-۴-۲- اندازه گیری (مورفومتری)

برای بدست آوردن میانگین اندازه نسبی بیشترین قطر گلبولهای سفید خونی ماهیان بررسی شده ، از میکروسکوب نوری و عدسی ۱۰۰ و نرم افزار میکرومتری نیمه خودکار Leica Qwin 550 استفاده شد . در ۵ ردیف موازی در محدوده ای از گسترش خونی که توزیع گلبولهای سفید نرمال بود حداقل ۱۰ سلول تیپیک از گلبولهای سفید اندازه گیری شد و داده های عددی فراهم آمده توسط نرم افزار با مقیاس میکرومتر یادداشت گردید . برای اندازه گیری قطر گرانولوسیت های نوتروفیلیک ، ائوزینوفیلیک و بازوفیلیک از گسترش های خونی رنگ شده با رومانوفسکی ، سودان بلک بی ، پرئودیک اسید شیف و پراکسیداز استفاده شد و میانگین بدست آمده از اندازه گیری های فوق برای هر سلول ثبت گردید . برای اندازه گیری قطر گلبولهای سفید لنفوسیتی از گسترش خونی رنگ شده با رومانوفسکی ، نفتول AS-D

کلرو استات استراز و اسید فسفاتاز و برای مونوسیت از گسترش های خونی رنگ شده با رومانوفسکی ، آلفا نفتیل کلرو استات استراز و بتا گلوکورونیداز استفاده شد و میانگین داده ها برای هر سلول ثبت گردید (مراجعه به جداول ۲ و ۳ و ۴ و ۵).

۲-۴-۳-عکسبرداری

گسترش های رنگ آمیزی شده به روشهای یاد شده برای گرفتن تصویر هر یک از گلبولهای سفید خونی گونه های بررسی شده بکار برده شدند . همه لامهای رنگ آمیزی شده بررسی شده و تنها تصویر تیپیک هریک از سلولهای لکوسیتی در هر گونه با استفاده از میکروسکوپ نوری الیمپوس با CCD معمولی دارای بزرگنمایی ۵۰ x با کالیبراسیون اپتیک ۵۰۰۰ و نرم افزار Inter video NSIPV5 برداشت گردید و در بانک نرم افزاری کد گذاری و بایگانی شد.

برای جلوگیری از هر گونه خطا در داده های بدست آمده بویژه داده های عددی ، اندازه گیریها و مقیاس گذاری عکسها ، پس از هر ۱۰ بار اندازه گیری یا عکس برداری کارکرد نوری و نرم افزار همه میکروسکوپیهای مورد استفاده با لام مدرج کنترل می گردید.

۲-۵-بررسی های آماری

تمامی داده های اولیه در طی روند انجام آزمایشها اعم از داده های کیفی و کمی در یک گونه و در یک سن در مرحله پیش آزمون به کمک آنالیزهای پیش آزمون تست تی^۱ مورد آنالیز قرار گرفتند و داده های نهایی شده به روش تست تی^۲ و ANOVA و همچنین داده هایی که نتایج همتراز آنها در دسترس بوده با شیوه Poison بررسی و وابستگی و همبستگی آنها با حداکثر خطای قابل پذیرش ۰/۰۵ گزارش گردید .

^۱ - Pre-t-test

^۲ - Student's-t-test

فصل چهارم

نتایج

۱- یافته های مورفولوژی و شمارش نسبی :

۱-۱- نوتروفیل:

نوتروفیل های گرد با هسته های چند بخشی (یک تا پنج) با کروماتین هائی با رنگ پذیری کم تا بسیار، به فراوانی بسیار دیده شدند.

میانگین نوتروفیل ها در فیل ماهی های انگشت قد $48 \pm 1/37$ درصد (کمینه ۴۵ و بیشینه ۵۲)، فیل ماهی های یک ساله $44/9 \pm 1/28$ درصد (۴۲ و ۴۸)، فیل ماهی های دو ساله $40/0 \pm 1/88$ درصد (۳۵ و ۴۵)، فیل ماهی های سه ساله $50/3 \pm 2/68$ درصد (۴۳ و ۵۶) و فیل ماهی های هفت ساله $39/1 \pm 3/56$ درصد (۳۱ و ۴۹) بوده است.

میانگین نوتروفیل ها در تاس ماهیان انگشت قد $39/4 \pm 2/35$ درصد (کمینه ۲۹ و بیشینه ۴۱)، تاس ماهی ایرانی یک ساله $38/3 \pm 3/43$ درصد (۲۷ و ۴۷)، تاس ماهی ایرانی دو ساله $29/6 \pm 2/04$ درصد (۲۲ و ۳۲)، تاس ماهی ایرانی سه ساله $41/3 \pm 3/53$ درصد (۳۵ و ۴۹)، تاس ماهی ایرانی پنج ساله $35/5 \pm 1/67$ درصد (۳۲ و ۴۰) و تاس ماهی ایرانی یازده ساله $40/5 \pm 0/35$ درصد (۳۹ و ۴۱) می باشد.

میانگین نوتروفیل ها در شپ های انگشت قد $39/6 \pm 1/34$ درصد (کمینه ۳۷ و بیشینه ۴۳)، شپ های یک ساله $39/8 \pm 1/02$ درصد (۳۸ و ۴۴)، شپ های دو ساله $41/3 \pm 1/73$ درصد (۳۶ و ۴۵)، شپ های سه ساله $35/5 \pm 1/73$ درصد (۳۰ و ۴۱) و شپ های نه ساله $40/7 \pm 1/58$ درصد (۳۷ و ۴۴) بوده است.

میانگین نوتروفیل ها در ازون برون های انگشت قد $38/4 \pm 1/70$ درصد (کمینه ۳۵ و بیشینه ۴۲)، ازون برون های یک ساله $40/1 \pm 3/81$ درصد (۳۹ و ۵۰) و ازون برون های دو ساله $41/9 \pm 3/37$ درصد (۳۳ و ۴۹) می باشد.

میانگین نوتروفیل ها در تاس ماهیان روسی انگشت قد $31/9 \pm 4/43$ درصد (کمینه ۲۸ و بیشینه ۳۹) و تاس ماهیان روسی یک ساله $31/7 \pm 2/45$ درصد (۲۶ و ۳۵) بوده است.

در برخی از نمونه ها گونه های یاد شده شمار اندکی از نوتروفیل ها با داشتن سیتوپلاسم بی رنگ و گرانول های اسیدوفیلیک رنگ پریده تا اندازه ای و تنها در برخی از ویژگی های یاد شده با هتروفیل های گزارش شده همانندی نشان داده اند که در شمار نوتروفیل ها گزارش شدند. شمارش تفریقی و درصد نوتروفیل های هر یک از گونه های یاد شده در جدول شماره ۱ آمده است.

۱-۲- ائوزینوفیل :

ائوزینوفیل های گرد با هسته های چند بخشی (یک تا سه گهگاه تا چهار) با کروماتین هائی با رنگ پذیری کم تا متوسط، به فراوانی دیده شدند . میانگین ائوزینوفیل ها در فیل ماهی های انگشت قد $8/5 \pm 0/85$ درصد (کمینه ۶ و بیشینه ۱۰)، فیل ماهی های یک ساله $7/36 \pm 1/19$ درصد (۵ و ۱۰)، فیل ماهی های دو ساله $10/6 \pm 1/76$ درصد (۷ و ۱۵)، فیل ماهی های سه ساله $11/7 \pm 1/18$ درصد (۱۰ و ۱۵) و فیل ماهی های هفت ساله $4/4 \pm 1/28$ درصد (۳ و ۹) بوده است.

میانگین ائوزینوفیل ها در تاس ماهیان ایرانی انگشت قد $8/9 \pm 0/69$ درصد (کمینه ۶ و بیشینه ۱۰)، تاس ماهیان ایرانی یک ساله $7/7 \pm 2/38$ درصد (۳ و ۱۵)، تاس ماهیان ایرانی دو ساله $6/9 \pm 1/53$ درصد (۳ و ۱۰)، تاس ماهیان ایرانی سه ساله $8/9 \pm 2/92$ درصد (۳ و ۱۶)، تاس ماهیان ایرانی پنج ساله $13/7 \pm 1/89$ درصد (۱۰ و ۱۷) و تاس ماهیان ایرانی یازده ساله $5/6 \pm 0/36$ درصد (۴ و ۶) می باشد.

میانگین ائوزینوفیل ها در شپ های انگشت قد $8/5 \pm 1/06$ درصد (کمینه ۶ و بیشینه ۱۱)، شپ های یک ساله $4/7 \pm 0/47$ درصد (۳ و ۶)، شپ های دو ساله $2/5 \pm 0/85$ درصد (۱ و ۵)، شپ های سه ساله $4/6 \pm 3/47$ درصد (۵ و ۷) و شپ های نه ساله $6/9 \pm 0/80$ درصد (۵ و ۹) بوده است.

میانگین ائوزینوفیل ها در ازون برون های انگشت قد $8/8 \pm 1/03$ درصد (کمینه ۷ و بیشینه ۱۱)، ازون برون یک ساله $8/6 \pm 1/86$ درصد (۵ و ۱۶) و ازون برون دو ساله $9/5 \pm 2/72$ درصد (۴ و ۱۶) می باشد. میانگین ائوزینوفیل ها در تاس ماهیان روسی انگشت قد $6/6 \pm 2/37$ درصد (کمینه ۵ و بیشینه ۱۱) و تاس ماهیان روسی یک ساله $7/4 \pm 1/76$ درصد (۴ و ۱۲) بوده است.

در نمونه های گونه های یاد شده ائوزینوفیلها با داشتن گرانول های ائوزینوفیلی درشت و گرد با رنگ پذیری مناسب به خوبی از سلول های نوتروفیلی و یا همانند آن قابل تفکیک بودند. شمارش تفریقی و درصد ائوزینوفیلهای هر یک از گونه های یاد شده در جدول شماره ۱ آمده است .

۱-۳- بازوفیل :

بازوفیل های گرد با هسته های یک تا دو بخشی مرکزی با کروماتین بسیار رنگ پذیرتر از دیگر گرانولوسیت ها ، بسیار کمیاب بودند و در همه گونه ها دیده نشدند.

میانگین بازوفیل ها در فیل ماهی های هفت ساله $0/1$ درصد و در شپ های نه ساله ۱ درصد می باشد.

۴-۱- لنفوسیت :

لنفوسیت های کوچک، متوسط و بزرگ بسته به اندازه کلی سلول به شکل گرد که بیشترین نسبت هسته به سیتوپلاسم را در همه لکوسیت ها داشتند با کروماتینی پررنگ به فراوانی بسیار دیده شدند. میانگین لنفوسیت ها در فیل ماهی های انگشت قد $1/73 \pm 36/7$ درصد (کمینه ۳۱ و بیشینه ۳۹)، فیل ماهی های یک ساله $3/16 \pm 39/5$ درصد (۳۱ و ۴۷)، فیل ماهی های دو ساله $1/65 \pm 45/9$ درصد (۴۱ و ۴۹)، فیل ماهی های سه ساله $3/19 \pm 32/6$ درصد (۲۳ و ۴۰) و فیل ماهی های هفت ساله $3/80 \pm 50/0$ درصد (۳۹ و ۶۱) بوده است.

میانگین لنفوسیت ها در تاس ماهیان ایرانی انگشت قد $0/79 \pm 47/3$ درصد (کمینه ۴۵ و بیشینه ۵۰)، تاس ماهیان ایرانی یک ساله $3/80 \pm 46/8$ درصد (۳۹ و ۵۷)، تاس ماهیان ایرانی دو ساله $2/95 \pm 54/7$ درصد (۵۱ و ۶۴)، تاس ماهیان ایرانی سه ساله $3/84 \pm 44/6$ درصد (۳۸ و ۵۱)، تاس ماهیان ایرانی پنج ساله $1/15 \pm 47/5$ درصد (۴۵ و ۵۱) و تاس ماهیان ایرانی یازده ساله $0/79 \pm 49/7$ درصد (۴۷ و ۵۲) می باشد. میانگین لنفوسیت ها در شپ ماهی های انگشت قد $1/19 \pm 47/6$ درصد (کمینه ۴۵ و بیشینه ۵۱)، شپ های یک ساله $3/75 \pm 48/3$ درصد (۴۵ و ۴۹)، شپ های دو ساله $2/82 \pm 51/8$ درصد (۴۵ و ۵۷)، شپ های سه ساله $1/42 \pm 42/5$ درصد (۳۸ و ۴۷) و شپ های نه ساله $1/15 \pm 49/1$ درصد (۴۷ و ۵۲) بوده است. میانگین لنفوسیت ها در ازون برون ماهی های انگشت قد $2/34 \pm 50/3$ درصد (کمینه ۴۴ و بیشینه ۵۴)، ازون برون یک ساله $4/31 \pm 38/4$ درصد (۳۵ و ۴۸) و ازون برون دو ساله $3/08 \pm 44/9$ درصد (۴۱ و ۵۴) می باشد.

میانگین لنفوسیت ها در تاس ماهیان روسی انگشت قد $2/57 \pm 56/0$ درصد (کمینه ۴۸ و بیشینه ۵۹) و تاس ماهیان روسی یک ساله $3/33 \pm 55/2$ درصد (۴۹ و ۶۲) بوده است.

در برخی از نمونه های گونه های یاد شده شماری از لنفوسیت های همانند با پلاسماسل با هسته های غیر مرکزی و محتوی سیتوپلاسمی یک سویه و فراوان که ویژگی کلاهیک گلژی روی هسته را نداشتند دیده شد و شماری دیگر از لنفوسیت ها ریخت نابهنجار، نیمه گرد تا بیضوی داشتند. شمارش تفریقی و درصد لنفوسیت های هر یک از گونه های یاد شده در جدول ۱ آمده است.

۵-۱- مونوسیت :

بزرگ ترین لکوسیت های خون با هسته ای گرد تا متمایل به دو یا سه بخشی با کروماتین هائی با رنگ پذیری متوسط تا بسیار با نسبت کم هسته به سیتوپلاسم به تعداد کم دیده شدند.

میانگین مونوسیت ها در فیل ماهی های انگشت قد $6/8 \pm 0/88$ درصد (کمینه ۵ و بیشینه ۹)، فیل ماهی های یک ساله $8/3 \pm 2/51$ درصد (۲ و ۱۳)، فیل ماهی های دو ساله $3/5 \pm 1/68$ درصد (۱ و ۶)، فیل ماهی های سه ساله $5/4 \pm 1/73$ درصد (۱ و ۱۱) و فیل ماهی های هفت ساله $2/25 \pm 4/5$ درصد (۱ و ۹) بوده است.

میانگین مونوسیت ها در تاس ماهیان ایرانی انگشت قد $6/7 \pm 1/33$ درصد (کمینه ۴ و بیشینه ۱۲)، تاس ماهیان ایرانی یک ساله $7/2 \pm 2/25$ درصد (۳ و ۱۱)، تاس ماهیان ایرانی دو ساله $3/8 \pm 1/33$ درصد (۱ و ۷)، تاس ماهیان ایرانی سه ساله $5/2 \pm 2/1$ درصد (۲ و ۱۱)، تاس ماهیان ایرانی پنج ساله $3/8 \pm 1/4$ درصد (۱ و ۹) و تاس ماهیان ایرانی یازده ساله $4/2 \pm 0/48$ درصد (۳ و ۶) می باشد.

میانگین مونوسیت ها در شپ ماهی های انگشت قد $4/3 \pm 0/63$ درصد (کمینه ۳ و بیشینه ۶)، شپ های یک ساله $4/3 \pm 0/33$ درصد (۳ و ۵)، شپ های دو ساله $4/4 \pm 1/58$ درصد (۲ و ۱۰)، شپ های سه ساله $5/0 \pm 0/63$ درصد (۳ و ۷) و شپ های نه ساله $3/3 \pm 1/73$ درصد (۱ و ۱۰) بوده است. میانگین مونوسیت ها در ازون برون های انگشت قد $2/5$ درصد (کمینه ۱ و بیشینه ۵)، ازون برون یک ساله $3/7$ درصد (۱ و ۶) و ازون برون دو ساله $3/7$ درصد (۲ و ۶) می باشد.

میانگین مونوسیت ها در تاس ماهیان روسی انگشت قد $5/5 \pm 1/73$ درصد (کمینه ۱ و بیشینه ۹) و تاس ماهیان روسی یک ساله $5/7 \pm 2/40$ درصد (۱ و ۱۲) بوده است.

در گونه های بررسی شده اندازه بسیار سیتوپلاسم که بیشتر دارای واکوئول های قابل مشاهده بوده اند شناسائی مونوسیت را از دیگر لکوسیت ها انجام پذیر می ساخت. شمارش تفریقی و درصد مونوسیت های هر یک از گونه های یاد شده در جدول شماره ۱ آمده است.

۲- یافته های مورفومتری :

۲-۱- نوتروفیل:

نوتروفیل ها با گرانول های سیتوپلاسمی فراوان با اندازه نسبی کوچک تر از مونوسیت و ائوزینوفیل و بزرگ تر از لنفوسیت اندازه گیری شدند.

میانگین اندازه نوتروفیل ها در فیل ماهی های انگشت قد $11/02 \pm 1/16$ میکرومتر (کمینه $7/08$ و بیشینه $12/76$)، فیل ماهی های یک ساله $10/30 \pm 1/41$ میکرومتر ($6/28$ و $12/78$)، فیل ماهی های دو ساله $9/13 \pm 1/48$ میکرومتر ($5/31$ و $11/78$)، فیل ماهی های سه ساله $11/59 \pm 0/6$ میکرومتر ($11/15$ و $12/41$) و فیل ماهی های هفت ساله $8/44 \pm 1/42$ میکرومتر ($5/67$ و $10/86$) بوده است.

میانگین اندازه نوتروفیل ها در تاس ماهیان ایرانی انگشت قد $11/82 \pm 1/19$ میکرومتر (کمینه 9/99 و بیشینه 14/49)، تاس ماهیان ایرانی یک ساله $11/21 \pm 0/91$ میکرومتر (9/17 و 14/20)، تاس ماهیان ایرانی دو ساله $9/00 \pm 1/73$ میکرومتر (6/91 و 12/89)، تاس ماهیان ایرانی سه ساله $8/14 \pm 1/08$ میکرومتر (6/11 و 11/73)، تاس ماهیان ایرانی پنج ساله $11/97 \pm 1/13$ میکرومتر (9/05 و 14/98) و تاس ماهیان ایرانی یازده ساله $9/63 \pm 1/16$ میکرومتر (7/85 و 12/36) می باشد.

میانگین اندازه نوتروفیل ها در شپ های انگشت قد $9/10 \pm 1/35$ میکرومتر (کمینه 7/07 و بیشینه 11/72)، شپ های یک ساله $9/51 \pm 0/67$ میکرومتر (7/06 و 11/30)، شپ های دو ساله $9/43 \pm 1/15$ میکرومتر (6/82 و 12/01)، شپ های سه ساله $8/44 \pm 0/62$ میکرومتر (7/20 و 10/42) و شپ های نه ساله $11/05 \pm 1/59$ میکرومتر (8/65 و 14/45) بوده است.

میانگین اندازه نوتروفیل ها در ازون برون های انگشت قد $8/49 \pm 1/51$ میکرومتر (کمینه 6/13 و بیشینه 12/13)، ازون برون های یک ساله $13/28 \pm 1/46$ میکرومتر (8/84 و 13/29) و ازون برون های دو ساله $9/39 \pm 0/49$ میکرومتر (7/37 و 12/25) می باشد.

میانگین اندازه نوتروفیل ها در تاس ماهیان روسی انگشت قد $9/39 \pm 1/51$ میکرومتر (کمینه 7/93 و بیشینه 12/54) و تاس ماهیان روسی یک ساله $10/43 \pm 1/86$ میکرومتر (3/13 و 12/91) بوده است. میانگین اندازه نوتروفیل های گونه های یاد شده بر حسب میکرومتر و مقادیر انحراف معیار در جدول شماره 2 آمده است.

۲-۲- ائوزینوفیل :

ائوزینوفیل ها کوچکتر از مونوسیت ها و کمی بزرگ تر از نوتروفیل ها اندازه گیری شدند و دارای تعداد کمی گرانول های بزرگ گرد و گاه میله ای شکل بودند.

میانگین اندازه ائوزینوفیل ها در فیل ماهی های انگشت قد $13/88 \pm 0/92$ میکرومتر (کمینه 12/19 و بیشینه 17/28)، فیل ماهی های یک ساله $12/52 \pm 0/92$ میکرومتر (10/36 و 15/44)، فیل ماهی های دو ساله $14/13 \pm 0/79$ میکرومتر (12/11 و 17/93)، فیل ماهی های سه ساله $14/06 \pm 0/79$ میکرومتر (12/68 و 17/16) و فیل ماهی های هفت ساله $8/77 \pm 0/80$ میکرومتر (6/21 و 11/27) بوده است.

میانگین اندازه ائوزینوفیل ها در تاس ماهیان ایرانی انگشت قد $13/58 \pm 0/75$ میکرومتر (کمینه 11/82 و بیشینه 15/30)، تاس ماهیان ایرانی یک ساله $13/98 \pm 0/99$ میکرومتر (11/97 و 16/63)، تاس ماهیان ایرانی دو ساله $9/56 \pm 0/77$ میکرومتر (7/95 و 12/24)، تاس ماهیان ایرانی سه ساله $10/56 \pm 1/00$ میکرومتر

(۸/۹۵ و ۱۳/۴۶)، تاس ماهیان ایرانی پنج ساله $1/61 \pm 13/54$ میکرومتر (۹/۶۷ و ۱۷/۱۵) و تاس ماهیان ایرانی یازده ساله $0/95 \pm 12/27$ میکرومتر (۸/۲۱ و ۱۳/۶۲) می باشد.

میانگین اندازه ائوزینوفیل ها در شپ های انگشت قد $0/66 \pm 12/39$ میکرومتر (کمینه ۱۰/۸۷ و بیشینه ۱۴/۳۶)، شپ های یک ساله $0/42 \pm 11/97$ میکرومتر (۱۱/۰۷ و ۱۳/۶۵)، شپ های دو ساله $0/16 \pm 12/50$ میکرومتر (۱۱/۴۶ و ۱۲/۵۹)، شپ های سه ساله $0/15 \pm 8/48$ میکرومتر (۷/۹۸ و ۸/۹۹) و شپ های ۴ ساله $0/83 \pm 14/26$ میکرومتر (۱۳/۱۶ و ۱۵/۶۶) بوده است.

میانگین اندازه ائوزینوفیل ها در ازون برون های انگشت قد $0/52 \pm 11/03$ میکرومتر (کمینه ۹/۴۲ و بیشینه ۱۲/۷۲)، ازون برون های یک ساله $0/28 \pm 13/28$ میکرومتر (۱۲/۷۵ و ۱۳/۶۷) و ازون برون های دو ساله $0/09 \pm 16/44$ میکرومتر (۱۶/۰۳ و ۱۶/۴۹) می باشد.

میانگین اندازه ائوزینوفیل ها در تاس ماهیان روسی انگشت قد $0/90 \pm 12/93$ میکرومتر (کمینه ۱۰/۱۷ و بیشینه ۱۴/۹۰) و تاس ماهیان روسی یک ساله $0/82 \pm 14/63$ میکرومتر (۱۰/۹۰ و ۱۹/۸۸) بوده است. میانگین اندازه ائوزینوفیل های گونه های یاد شده بر حسب میکرومتر و مقادیر انحراف معیار در جدول شماره ۳ آمده است.

۲-۳- بازوفیل :

بازوفیل ها با اندازه ای کوچک تر از ائوزینوفیل ها و کمی بزرگ تر از نوتروفیل ها با محتوای سیتوپلاسمی بیشتر و اغلب با گرانول های تخلیه شده و گاه دارای واکوئول شناسائی شدند. اندازه بازوفیل ها در فیل ماهی های هفت ساله $9/26$ میکرومتر و در شپ ۴ ساله $11/16$ میکرومتر بوده است.

۲-۴- لنفوسیت :

لنفوسیت های کوچک با حلقه ای از سیتوپلاسم آبی رنگ اطراف هسته، لنفوسیت های بزرگ با نواری پهن از سیتوپلاسم اطراف هسته و پلاسماسل ها (؟) با هسته خارج مرکزی و سیتوپلاسم پهن یک طرفه شناسائی شدند.

میانگین اندازه لنفوسیت ها در فیل ماهی های انگشت قد $0/09 \pm 6/42$ میکرومتر (کمینه ۶/۱۳ و بیشینه ۶/۷۲)، فیل ماهی های یک ساله $0/30 \pm 5/83$ میکرومتر (۵/۱۳ و ۶/۹۷)، فیل ماهی های دو ساله $0/72 \pm 5/49$ میکرومتر (۳/۳۱ و ۷/۳۸)، فیل ماهی های سه ساله $0/32 \pm 4/85$ میکرومتر (۴/۰۷ و ۶/۸۸) و فیل ماهی های هفت ساله $0/45 \pm 5/37$ میکرومتر (۴/۱۶ و ۶/۵۶) بوده است.

میانگین اندازه نفوسیت ها در تاس ماهیان ایرانی انگشت قد 19 ± 0.70 میکرومتر (کمینه $4/58$ و بیشینه $5/79$)، تاس ماهیان ایرانی یک ساله $0.6 \pm 6/28$ میکرومتر ($6/04$ و $6/69$)، تاس ماهیان ایرانی دو ساله $1/11 \pm 5/98$ میکرومتر ($4/40$ و $9/83$)، تاس ماهیان ایرانی سه ساله $0.95 \pm 5/45$ میکرومتر ($4/42$ و $7/96$)، تاس ماهیان ایرانی پنج ساله $0.38 \pm 6/66$ میکرومتر ($5/44$ و $7/89$) و تاس ماهیان ایرانی یازده ساله $0.19 \pm 5/84$ میکرومتر ($5/56$ و $6/68$) می باشد.

میانگین اندازه نفوسیت ها در شپ های انگشت قد $1/69 \pm 5/44$ میکرومتر (کمینه $4/24$ و بیشینه $6/64$)، شپ های یک ساله $0.35 \pm 5/21$ میکرومتر ($4/07$ و $6/34$)، شپ های دو ساله $0.59 \pm 4/81$ میکرومتر ($3/54$ و $5/96$)، شپ های سه ساله $0.30 \pm 5/05$ میکرومتر ($4/08$ و $5/99$) و شپ های نه ساله $0.26 \pm 6/34$ میکرومتر ($5/37$ و $6/92$) بوده است.

میانگین اندازه نفوسیت ها در ازون برون های انگشت قد $0.59 \pm 6/53$ میکرومتر (کمینه $5/08$ و بیشینه $8/49$)، ازون برون های یک ساله $0.66 \pm 6/33$ میکرومتر ($4/20$ و $8/39$) و ازون برون های دو ساله $0.98 \pm 5/38$ میکرومتر ($4/24$ و $9/32$) می باشد.

میانگین اندازه نفوسیت ها در تاس ماهیان روسی انگشت قد $0.50 \pm 6/07$ میکرومتر (کمینه $4/71$ و بیشینه $8/64$) و تاس ماهیان روسی یک ساله $0.60 \pm 7/30$ میکرومتر ($6/09$ و $8/93$) بوده است. با توجه به اندازه نفوسیت های شناسایی شده در این ماهیان در دو دسته نفوسیت های کوچک و بزرگ قابل طبقه بندی هستند.

میانگین اندازه نفوسیت های کوچک در فیل ماهی های انگشت قد $4/58$ میکرومتر (کمینه $4/48$ و بیشینه $4/75$)، فیل ماهی های یکساله $3/61$ میکرومتر ($3/55$ و $3/83$)، فیل ماهی های دو ساله $3/67$ میکرومتر ($3/31$ و $4/64$)، فیل ماهی های سه ساله $4/22$ میکرومتر ($4/07$ و $4/39$) و فیل ماهی های هفت ساله $4/69$ میکرومتر ($4/16$ و $4/77$) بوده است.

میانگین اندازه نفوسیت های کوچک در تاس ماهیان ایرانی انگشت قد $4/84$ میکرومتر (کمینه $4/59$ و بیشینه $4/90$)، تاس ماهیان ایرانی یکساله $4/58$ میکرومتر ($4/33$ و $4/79$)، تاس ماهیان ایرانی دو ساله $4/58$ میکرومتر ($4/47$ و $4/72$)، تاس ماهیان ایرانی سه ساله $4/52$ میکرومتر ($4/42$ و $4/71$)، تاس ماهیان ایرانی پنج ساله $4/63$ میکرومتر ($4/38$ و $4/80$) و تاس ماهیان ایرانی یازده ساله $4/68$ میکرومتر ($4/44$ و $4/75$) می باشد.

میانگین اندازه نفوسیت های کوچک در شپ های انگشت قد $4/67$ میکرومتر (کمینه $4/24$ و بیشینه $5/01$)، شپ های یکساله $4/36$ میکرومتر ($3/77$ و $4/45$)، شپ های دو ساله $4/25$ میکرومتر ($3/54$ و

(۴/۷۱) شیب های سه ساله ۴/۲۳ میکرومتر (۴/۰۵ و ۴/۴۷) و شیب های نه ساله ۴/۳۶ میکرومتر (۳/۵۷ و ۴/۴۴) بوده است .

میانگین اندازه لنفوسیت های کوچک در ازون برون های انگشت قد ۴/۸۲ میکرومتر (کمینه ۴/۳۲ و بیشینه ۴/۹۲) ، ازون برون های یکساله ۴/۸۸ میکرومتر (۳/۸۰ و ۴/۹۷) و ازون برون های دو ساله ۴/۳۹ میکرومتر (۴/۲۴ و ۴/۶۵) می باشد .

میانگین اندازه لنفوسیت های کوچک در تاس ماهیان روسی انگشت قد ۴/۷۱ میکرومتر (کمینه ۴/۶۹ و بیشینه ۴/۸۰) و تاس ماهیان روسی یکساله ۴/۵۵ میکرومتر (۳/۸۶ و ۴/۵۷) بوده است .

میانگین اندازه لنفوسیت های بزرگ در فیل ماهی های انگشت قد ۶/۴۲ میکرومتر (کمینه ۶/۱۳ و بیشینه ۶/۷۲) ، فیل ماهی های یکساله ۶/۲۷ میکرومتر (۵/۵۸ و ۶/۹۷) ، فیل ماهی های دو ساله ۷/۰۱ میکرومتر (۶/۶۴ و ۷/۳۸) ، فیل ماهی های سه ساله ۶/۱۱ میکرومتر (۵/۷۳ و ۶/۲۷) و فیل ماهی های هفت ساله ۵/۸۰ میکرومتر (۵/۳۴ و ۶/۵۶) بوده است .

میانگین اندازه لنفوسیت های بزرگ در تاس ماهیان ایرانی انگشت قد ۵/۸۲ میکرومتر (کمینه ۵/۶۱ و ۵/۹۳) ، تاس ماهیان ایرانی یکساله ۶/۰۸ میکرومتر (۶/۰۴ و ۶/۱۲) ، تاس ماهیان ایرانی دو ساله ۶/۶۲ میکرومتر (۵/۰۲ و ۹/۸۳) ، تاس ماهیان ایرانی سه ساله ۶/۴۶ میکرومتر (۵/۰۷ و ۷/۴۶) ، تاس ماهیان ایرانی پنج ساله ۷/۸۵ میکرومتر (۷/۸۰ و ۷/۸۸) و تاس ماهیان ایرانی یازده ساله ۷/۸۹ میکرومتر (۷/۶۳ و ۷/۹۷) می باشد .

میانگین اندازه لنفوسیت های بزرگ در شیب های انگشت قد ۶/۹۶ میکرومتر (کمینه ۶/۶۴ و بیشینه ۶/۹۹) ، شیب های یکساله ۶/۶۲ میکرومتر (۵/۷۴ و ۶/۶۸) . شیب های دو ساله ۶/۲۳ میکرومتر (۵/۹۶ و ۶/۵۱) ، شیب های سه ساله ۶/۸۵ میکرومتر (۶/۰۳ و ۷/۱۶) و شیب های نه ساله ۶/۳۴ میکرومتر (۵/۳۷ و ۶/۹۲) بوده است .

میانگین اندازه لنفوسیت های بزرگ در ازون برون های انگشت قد ۶/۵۳ میکرومتر (کمینه ۵/۰۸ و بیشینه ۸/۴۹) ، ازون برون های یکساله ۸/۶۴ میکرومتر (۷/۲۲ و ۸/۹۷) و ازون برون های دو ساله ۹/۴۷ میکرومتر (۹/۳۲ و ۹/۶۵) می باشد .

میانگین اندازه لنفوسیت های بزرگ در تاس ماهیان روسی انگشت قد ۶/۷۵ میکرومتر (کمینه ۵/۶۵ و بیشینه ۷/۸۵) و تاس ماهیان روسی یکساله ۷/۴۳ میکرومتر (۶/۱۲ و ۸/۹۳) بوده است . میانگین اندازه لنفوسیت های گونه های یاد شده بر حسب میکرومتر و مقادیر انحراف معیار در جدول شماره ۴ آمده است .

۲-۵- مونسیت :

بزرگترین سلول های دارای واکوئول های آشکار و گرد و سیتوپلاسم فراوان و گسترده به عنوان مونسیت شناسائی شدند.

میانگین اندازه مونسیت ها در فیل ماهی های انگشت قد $18/04 \pm 0/04$ میکرومتر (کمینه $18/00$ و بیشینه $18/09$)، فیل ماهی های یک ساله $15/45 \pm 0/27$ میکرومتر ($14/89$ و $16/56$)، فیل ماهی های دو ساله $15/15 \pm 0/15$ میکرومتر ($18/19$ و $18/49$)، فیل ماهی های سه ساله $15/46 \pm 0/52$ میکرومتر ($13/72$ و $17/05$) و فیل ماهی های هفت ساله $13/11 \pm 0/81$ میکرومتر ($11/33$ و $15/04$) بوده است.

میانگین اندازه مونسیت ها در تاس ماهیان ایرانی انگشت قد $16/25 \pm 0/71$ میکرومتر (کمینه $14/00$ و بیشینه $18/50$)، تاس ماهیان ایرانی یک ساله $13/23 \pm 0/24$ میکرومتر ($12/22$ و $13/67$)، تاس ماهیان ایرانی دو ساله $9/60 \pm 0/28$ میکرومتر ($8/35$ و $9/69$)، تاس ماهیان ایرانی سه ساله $13/56 \pm 0/70$ میکرومتر ($10/88$ و $14/68$)، تاس ماهیان ایرانی پنج ساله $9/99 \pm 0/21$ میکرومتر ($9/37$ و $10/75$) و تاس ماهیان ایرانی یازده ساله $11/10 \pm 0/54$ میکرومتر ($10/38$ و $13/42$) می باشد.

میانگین اندازه مونسیت ها در شپ ماهی های انگشت قد $14/25 \pm 1/06$ میکرومتر (کمینه $11/43$ و بیشینه $16/09$)، شپ های یک ساله $13/66 \pm 0/60$ میکرومتر ($11/62$ و $15/41$)، شپ های دو ساله $12/93 \pm 0/16$ میکرومتر ($12/42$ و $13/44$)، شپ های سه ساله $12/77 \pm 0/36$ میکرومتر ($11/29$ و $13/45$) و شپ های نه ساله $11/01 \pm 0/53$ میکرومتر ($10/92$ و $13/40$) بوده است.

میانگین اندازه مونسیت ها در ازون برون های انگشت قد $13/83 \pm 0/28$ میکرومتر (کمینه $13/01$ و بیشینه $13/66$)، ازون برون های یک ساله $13/93 \pm 0/15$ میکرومتر ($13/43$ و $14/43$) و ازون برون های دو ساله $13/33 \pm 0/29$ میکرومتر ($13/24$ و $14/63$) می باشد.

میانگین اندازه مونسیت ها در تاس ماهیان روسی انگشت قد $14/15 \pm 0/40$ میکرومتر (کمینه $12/86$ و بیشینه $15/44$) و تاس ماهیان روسی یک ساله $17/01 \pm 1/12$ میکرومتر ($13/09$ و $19/67$) بوده است. میانگین اندازه مونسیت های گونه های یاد شده بر حسب میکرومتر و مقادیر انحراف معیار در جدول شماره ۵ آمده است .

۳- یافته های سیتوشیمیائی :

۳-۱- رنگ پذیری با رنگ آمیزی رومانوفسکی :

نوتروفیل ها با هسته های رنگ پذیر، پر تراکم و کروماتینی پراکنده تر از کروماتین هسته بازوفیل ها، سیتوپلاسم ائوزینوفیلیک، بسیار کم رنگ و دارای گرانول های ائوزینوفیلیک کم رنگ در رنگ آمیزی رومانوفسکی دیده شدند.

ائوزینوفیل ها با هسته بی قاعده با کروماتین کم تراکم تا متوسط، سیتوپلاسم کمی بازوفیلیک تا ائوزینوفیلیک و گرانول دار دیده شدند. بازوفیل ها با هسته های دارای کروماتین شدیداً متراکم و رنگ پذیرتر از نوتروفیل و سیتوپلاسم فراوان تر به رنگ آبی خاکستری و واکوئل دار دیده شدند. لنفوسیت ها با هسته بسیار متراکم در لنفوسیت های کوچک و بزرگ، سیتوپلاسم بازوفیلیک و باریک و در لنفوسیت کوچک سیتوپلاسم پهن دور هسته دیده شدند.

مونوسیت ها با هسته نسبتاً متراکم، سیتوپلاسم بازوفیلیک فراوان، گرانول آزروفیلیک و واکوئل های سیتوپلاسمی دیده شدند.

۳-۲- رنگ پذیری با سودان بلک بی :

رنگ پذیری نوتروفیل ها با رنگ آمیزی سودان بلک بی در فیل ماهی های انگشت قد ، یک ساله ، دو ساله و سه ساله مثبت و هفت ساله ضعیف بوده است . در تاس ماهیان ایرانی انگشت قد ، یکساله ، دو ساله، سه ساله مثبت و پنج ساله مثبت و یازده ساله ضعیف بوده است. در شپ ماهی های انگشت قد ، یک ساله ، دو ساله و سه ساله مثبت و در نه ساله مثبت ضعیف بوده است . در ازون برون های انگشت قد ، یک ساله و دو ساله ضعیف می باشد، در تاس ماهیان روسی انگشت قد مثبت و در یک ساله مثبت ضعیف بوده است.

رنگ پذیری ائوزینوفیل ها در رنگ آمیزی سودان بلک بی در فیل ماهی های انگشت قد ، یک ساله و دو ساله مثبت و سه ساله و هفت ساله منفی بوده است . در تاس ماهیان ایرانی انگشت قد مثبت، یک ساله ضعیف، دو ساله مثبت ، سه ساله ، پنج ساله و یازده ساله ضعیف بوده است. در شپ ماهی های انگشت قد مثبت و یک ساله مثبت و دو ساله ، سه ساله و نه ساله ضعیف بوده است . در ازون برون های انگشت قد مثبت، یک ساله و دو ساله ضعیف می باشد. در تاس ماهیان روسی انگشت قد مثبت و در یک ساله منفی بوده است.

رنگ پذیری لئفوسیت ها و مونوسیت ها در همه سنین و گونه ها در رنگ آمیزی سودان بلک بی منفی بوده است. رنگ پذیری لکوسیت ها در گونه های یاد شده با رنگ سودان بلک بی در جدول شماره ۶ آمده است .

۳-۳- رنگ پذیری با پرئودیک اسید شیف :

رنگ پذیری نوتروفیل ها با پرئودیک اسید شیف در فیل ماهی ها در همه سنین مثبت بوده است، در تاس ماهیان ایرانی در همه سنین ، در شیب در همه سنین ، در ازون برون و تاس ماهی روسی در همه سنین مثبت بوده است.

رنگ پذیری ائوزینوفیل ها با پرئودیک اسید شیف در فیل ماهی های انگشت قد منفی، در یک ساله ضعیف ، در دو ساله و سه ساله متغیر و در هفت ساله ضعیف بوده است. در تاس ماهیان ایرانی انگشت قد، یک ساله ، دو ساله ، سه ساله و پنج ساله ضعیف و یازده ساله متغیر بوده است. در شیب های انگشت قد ، یک ساله ، دو و سه ساله مثبت ضعیف و در نه ساله ها متغیر بوده است. در ازون برون های انگشت قد مثبت، یک ساله و دو ساله مثبت ضعیف بوده است و در تاس ماهیان روسی انگشت قد و یک ساله مثبت ضعیف بوده است.

رنگ پذیری لئفوسیت ها با پرئودیک اسید شیف در فیل ماهی های انگشت قد و یکساله ضعیف و در دو ساله ، سه ساله و هفت ساله مثبت بوده است . در تاس ماهیان ایرانی انگشت قد ، یکساله و دو ساله ضعیف و در سه ساله ، پنج ساله و یازده ساله مثبت بوده است . در شیب های انگشت قد ، یکساله و دو ساله ضعیف و در سه ساله و نه ساله مثبت بوده است . در ازون برون های انگشت قد ، یکساله و دو ساله ضعیف بوده است و در تاس ماهیان روسی انگشت قد منفی و در یکساله مثبت بوده است .

رنگ پذیری مونوسیت ها با پرئودیک اسید شیف در همه سنین و همه گونه ها منفی بوده است . رنگ پذیری لکوسیتها در گونه های یاد شده با رنگ پرئودیک اسید شیف در جدول شماره ۶ آمده است .

۳-۴- رنگ پذیری با اسید فسفاتاز :

رنگ پذیری نوتروفیل ها در رنگ آمیزی اسید فسفاتاز در همه سنین و همه گونه ها منفی بوده است. رنگ پذیری ائوزینوفیل ها در اسید فسفاتاز در فیل ماهی های انگشت قد ضعیف، یک ساله و دو ساله منفی، سه ساله مثبت و هفت ساله ضعیف می باشد. در تاس ماهیان ایرانی انگشت قد، یک ساله و دو ساله ضعیف، در سه ساله مثبت ، در پنج ساله و یازده ساله ضعیف بوده است. در شیب های انگشت قد مثبت، در یک ساله منفی، در دو ساله ضعیف ، در سه ساله مثبت و در نه ساله مثبت ضعیف بوده است. در ازون

برون های انگشت قد ، یک ساله و دو ساله مثبت ضعیف بوده است. در تاس ماهیان روسی انگشت قد و یک ساله متغیر می باشد.

رنگ پذیری لنفوسیت ها در رنگ آمیزی اسید فسفاتاز در فیل ماهی های انگشت قد متغیر، در یک ساله ، دو ساله و سه ساله ها مثبت و در هفت ساله ضعیف بوده است.

در تاس ماهیان ایرانی انگشت قد ضعیف ، در یک ساله و دو ساله مثبت و در سه ساله ، پنج و هفت ساله ضعیف بوده است. در شیب های انگشت قد ضعیف و یک ساله، دو ساله و سه ساله مثبت و در نه ساله مثبت ضعیف می باشد. در ازون برون های انگشت قد و یک ساله مثبت و در دو ساله مثبت ضعیف بوده است . در تاس ماهیان روسی انگشت قد و یک ساله متغیر می باشد.

رنگ پذیری مونوسیت ها در رنگ آمیزی اسید فسفاتاز در همه سنین و همه گونه ها منفی بوده است. رنگ پذیری لکوسیتها در گونه های یاد شده با رنگ اسید فسفاتاز در جدول شماره ۶ آمده است .

۳-۵- رنگ پذیری با پراکسیداز :

رنگ پذیری نوتروفیل ها در فیل ماهی های انگشت قد و یکساله مثبت ، دو ساله و سه ساله ضعیف و در هفت ساله مثبت بوده است . در تاس ماهیان ایرانی انگشت قد مثبت ، یکساله ضعیف ، دو ساله مثبت ، سه و پنج ساله ضعیف و یازده ساله مثبت بوده است . در شیب های انگشت قد مثبت ، یکساله ضعیف ، دو ساله مثبت و سه و نه ساله ضعیف بوده است . در ازون برون های انگشت قد مثبت یک و دو ساله ضعیف بوده است و در تاس ماهیان روسی ضعیف بوده است . ائورینوفیل ها با پراکسیداز در همه گونه ها و همه سنین نمونه گیری شده واکنش مثبت و لنفوسیت ها و مونوسیت ها در همه سنین و گونه ها واکنش منفی نشان دادند . رنگ پذیری لکوسیتها در گونه های یاد شده با رنگ پراکسیداز در جدول شماره ۶ آمده است .

۳-۶- رنگ پذیری با نفتول AS – D کلرواستات استراز :

رنگ پذیری نوتروفیل ها با نفتول AS – D کلرواستات استراز در فیل ماهی های انگشت قد ، یک ساله ، دو ساله و سه ساله منفی و در هفت ساله ضعیف بوده است. در تاس ماهیان ایرانی انگشت قد و یک ساله منفی و در دو ساله و سه ساله متغیر و در پنج و یازده ساله منفی می باشد. در شیب های انگشت قد ، یک، دو، سه و نه ساله منفی می باشد. در ازون برون های انگشت قد ضعیف و یک و دو ساله منفی و در تاس ماهیان روسی انگشت قد ضعیف و یک ساله منفی می باشد.

رنگ پذیری ائوزینوفیل ها با نفتول AS – D کلرواستات استراز در فیل ماهی های انگشت قد منفی، در یک ساله، دو ساله و سه ساله مثبت ضعیف و در هفت ساله منفی بوده است. در تاس ماهیان ایرانی انگشت قد مثبت ضعیف، در یک ساله، دو ساله و سه ساله مثبت، در پنج ساله و یازده ساله متغیر می باشد. در شیب

های انگشت قد منفی ، یک ساله مثبت ، دو ساله منفی و در سه ساله و نه ساله متغیر بوده است. در ازون برون های انگشت قد منفی و در یک ساله و دو ساله ضعیف و در تاس ماهیان روسی انگشت قد و یک ساله متغیر می باشد.

رنگ پذیری لنفوسیت ها با نفتول $AS - D$ کلرواستات استراز در فیل ماهی های انگشت قد منفی، در یک ساله و دو ساله مثبت ضعیف، در سه ساله مثبت و در هفت ساله منفی بوده است. در تاس ماهیان ایرانی انگشت قد ضعیف و در یک ساله، دو ساله، سه ساله و پنج ساله مثبت و در یازده ساله ضعیف می باشد. در شیب های انگشت قد منفی ، یک ساله مثبت و دو ساله منفی و در سه ساله و نه ساله مثبت ضعیف می باشد. در ازون برون های انگشت قد ، یک ساله و دو ساله مثبت ضعیف بوده و در تاس ماهیان روسی انگشت قد منفی و یک ساله مثبت بوده است.

رنگ پذیری مونوسیت ها با کلرواستات استراز در همه سنین و همه گونه ها منفی می باشد. رنگ پذیری لکوسیتها در گونه های یاد شده با رنگ نفتول $AS - D$ کلرو استات استراز در جدول شماره ۶ آمده است .

۷-۳- رنگ پذیری با نفتیل استات استراز :

رنگ پذیری نوتروفیل ها با نفتیل استات استراز در همه سنین و همه گروه ها منفی بوده است. رنگ پذیری ائوزینوفیل ها با نفتیل استات استراز در فیل ماهی های انگشت قد منفی، یک ساله متغیر، دو ساله ، سه ساله و هفت ساله ضعیف می باشد. در تاس ماهیان ایرانی انگشت قد، یک ساله ، دو ساله و سه ساله منفی، پنج و یازده ساله ضعیف می باشد. در شیب های انگشت قد متغیر، یک ساله و دو ساله مثبت ضعیف، در سه ساله منفی و در نه ساله مثبت ضعیف بوده است. در ازون برون های انگشت قد ، یک ساله و دو ساله مثبت ضعیف می باشد. در چالباش های انگشت قد منفی و در یک ساله متغیر می باشد.

رنگ پذیری لنفوسیت ها با نفتیل استات استراز در فیل ماهی ها در همه سنین ضعیف و فقط در هفت ساله مثبت بوده است . در تاس ماهیان ایرانی انگشت قد و یکساله منفی ، دو ساله ضعیف ، سه ساله مثبت ، پنج ساله ضعیف و در ازون برون های انگشت قد منفی و یکساله و دو ساله ضعیف بوده است . در تاس ماهیان روسی انگشت قد منفی و در یکساله ها ضعیف بوده است .

رنگ پذیری مونوسیت ها با نفتیل استات استراز در فیل ماهی های انگشت قد ، یک ساله، دو ساله ، سه ساله و هفت ساله ضعیف می باشد. در تاس ماهیان ایرانی انگشت قد در یک ساله و دو ساله منفی سه ساله مثبت، پنج ساله ضعیف و یازده ساله منفی بوده است. در شیب ها در همه سنین مثبت ضعیف می باشد. در ازون برون های انگشت قد منفی و در یک ساله و دو ساله ضعیف بوده و در تاس ماهیان روسی

انگشت قد منفی و در یک ساله مثبت ضعیف می باشد. رنگ پذیری لکوسیتها در گونه های یاد شده با رنگ نفتیل استات استراز در جدول شماره ۶ آمده است .

۳-۸- رنگ پذیری با بتا گلوکورونیداز :

رنگ پذیری نوتروفیل ها، ائوزینوفیل ها، لنفوسیت ها با رنگ بتا گلوکورونیداز در همه سنین و همه گروه ها منفی بوده و رنگ پذیری مونوسیت ها تنها در فیل ماهی های هفت ساله تاس ماهیان ایرانی پنج و یازده ساله ، شپ ماهی های نه ساله، ازون برون های یکساله و دو ساله و تاس ماهی روسی یک ساله مثبت بودند و در تاس ماهیان ایرانی دو ساله و سه ساله ضعیف بوده است .

رنگ پذیری لکوسیتها در گونه های یاد شده با رنگ بتا گلوکورونیداز در جدول شماره ۶ آمده است . تصاویر مربوط به الگوی رنگ پذیری لکوسیتهای ماهیان خاویاری با هر یک از رنگ های ذکر شده در تصاویر ۷ تا ۲۵ آمده است .

فصل پنجم

بحث و تفسیر نتایج

چنان که آشکار است یکی از ارزشمندترین ماهیان زیست بوم ایران، ماهیان خاویاری می باشند و چون در میان ماهیان خاویاری جهان، ماهیان بومی آب های خزر بیشترین شمار و ارزش را دارند ، در گام نخست برای بررسی ویژگی های گوناگون هماتولوژیک و ایمونولوژیک ماهیان، این گونه ها برگزیده شده اند. بسیاری از داده های به دست آمده از پژوهش های پیشین درباره ماهیان بر پایه بررسی های سیتولوژیک با روش های رومانوفسکی می باشد و پس از آشکار شدن ناتوانی این روش در شناسائی درست گلبولهای سفید ، کارکرد بیولوژیک و نیز توانائی های سیتوشیمیائی سلول های خونی دیرهنگامی است که دانشمندان را بر آن می دارد که شگردهایی را بکار برند که این ناتوانی را زدوده و به توانائی آشکارسازی ویژگی های مورفولوژیک و سیتوشیمیائی سلول ها بیفزایند. همچنین برای نشان دادن چگونگی دگرگونی ها و وابستگی های نیائی سلول های هنجار در کنار آشکارسازی چگونگی پیدایش نابسامانی های مورفولوژیک و سیتوشیمیائی در سلول های نابهنجار و در زمان پاسخ های پاتولوژیک از این روش ها می توان استفاده کرد (۲۸ ، ۱۰۱ ، ۳۴).

گلبول های سفید ماهیان در رنگ آمیزی های رومانوفسکی چهره های گوناگونی دارند . پژوهندگان در گونه هائی از ماهیان با رده بندی های گوناگون سلول هائی همانند یا ناهمانند را یافته اند. در این پژوهش نیز بار دیگر سلول های خونی ماهیان خاویاری را از جهت بررسی هم خوانی آن با یافته های در دسترس از رنگ آمیزی های رومانوفسکی آزموده ایم . در این پژوهش نوتروفیل های ماهیان خاویاری در رنگ آمیزی رومانوفسکی ، سلول هایی گرد با هسته ای چندبخشی بوده اند که به فراوانی بسیار دیده شده اند که با یافته های زینکل و همکاران (۱۹۹۱) و پالیکووا و همکاران (۱۹۹۹) هماهنگ است . اگرچه با گزارش حامدی نهاوندی (۱۳۸۲) که لنفوسیت ها را بیش از دیگر گلبول های سفید خون تنها در تاس ماهی ایرانی ارائه نموده ناهمگون است.

گوناگونی بسیار زیادی در مورفولوژی نوتروفیل های تاس ماهی چینی از سوی زژیا و همکاران (۲۰۰۷) گزارش شده است که با یافته های حاصل از این پژوهش همخوانی ندارد. باری رنگ پذیری هسته و چگونگی آرایش آن نشانگر درستی الگوی مورفولوژیک گزارش شده در پژوهش حاضر می باشد. کروماتین نوتروفیل های دیده شده رنگ پذیری کم تا بسیار داشته اند که همخوانی بسیاری با یافته های زژیا و همکاران (۲۰۰۷) و زینکل و همکاران (۱۹۹۱) دارد.

میانگین اندازه نوتروفیل ها از مونوسیت ها و ائوزینوفیل ها کمتر و از لنفوسیت ها بیشتر بوده است. در فیل ماهی میانگین اندازه نوتروفیل با کمیته ۸/۴۴ و بیشینه ۱۱/۵۹ میکرومتر، تاس ماهی ایرانی با کمیته ۸/۱۴ و بیشینه ۱۱/۹۷ میکرومتر، شیپ با کمیته ۸/۴۴ و بیشینه ۱۱/۰۵ میکرومتر، ازون برون ۸/۹۴ با کمیته و بیشینه ۱۳/۲۸ میکرومتر و تاس ماهی روسی با کمیته ۹/۳۹ و بیشینه ۱۰/۴۳ میکرومتر دیده شد. این یافته ها

این گمان را بوجود می آورد که اندازه نسبی گلبول های گرانولوسیتی نوتروفیلی با افزایش سن کاهش نسبی می یابد ولی تحلیل آماری آین مطلب را تأیید نکرد . حامدی نهاوندی (۱۳۸۲) اندازه هتروفیل هارا که نزدیک ترین وابسته نوتروفیل می باشد ۱۸/۷۵ میکرومتر در تاس ماهی ایرانی گزارش نموده است، به ظاهر برتری با اندازه گیری به کمک نرم افزارهای تراز شده برای بررسی های اپتیک در پژوهش حاضر می باشد. با توجه به یافته های آماری دامنه تغییرات اندازه نوتروفیل ها به گونه تاس ماهی وابستگی ندارد. اندازه نوتروفیل ها در تاس ماهی روسی نسبت به سایر گونه ها کمی بزرگ تر می باشد که از نظر آماری معنی دار نیست ($P>0.05$). میانگین \pm انحراف معیار ارقام فوق در جدول شماره ۲ آمده است .

در این پژوهش میانگین نوتروفیل های ماهیان خاویاری در رنگ آمیزی شده به روش رومانوفسکی (گیمسا) در فیل ماهی ها ۳۹/۱-۵۰/۳ درصد بوده است که با یافته های بهمنی و همکاران (۲۰۰۱) که ۲۲/۶-۳۳/۹ درصد و پالیکووا و همکاران (۱۹۹۹) ۲۲-۲۵ درصد بوده است، همخوانی ندارد. اگرچه ایشان باور دارند که داده های آنها هماهنگی بسیاری با داده های پگاسو (۱۹۸۳) و جاکینکو (۱۹۸۰) دارد. در تاس ماهی ایرانی این میانگین ۲۹/۶-۴۱/۳ درصد بوده است که با یافته های بهمنی و همکاران (۲۰۰۱) (۲۰-۱۲/۳ درصد) همخوانی ندارد. در شیب این میانگین ۳۵/۵-۴۰/۷ درصد است که نخستین گزارش برای این گونه می باشد و گزارش دیگری در دسترس نیست. در ازون برون میانگین ۳۸/۴-۴۱/۹ درصد بوده که با یافته های پالیکووا و همکاران (۱۹۹۹) که ۲۱/۸-۲۵/۱ درصد بوده همخوانی ندارد . در تاس ماهی روسی میانگین ۳۱/۷-۳۱/۹ درصد بوده که نخستین گزارش برای این گونه می باشد و گزارش دیگری در دسترس نیست. این یافته ها در گونه های ماهیان خاویاری بررسی شده با سن همبستگی آماری نداشته است ($P>0.05$). میانگین \pm انحراف معیار این ارقام در جدول شماره ۱ آمده است .

اٹوزینوفیل های ماهیان خاویاری در رنگ آمیزی رومانوفسکی سلول هایی گرد با هسته چند بخشی بوده اند که به فراوانی دیده شده اند و با یافته های زینکل و همکاران (۱۹۹۱) و پالیکووا و همکاران (۱۹۹۹) هماهنگ است ولی با گزارش زریا و همکاران (۲۰۰۷) در مورفولوژی و رنگ پذیری هسته همخوانی ندارد چرا که در مطالعه حاضر اٹوزینوفیل های دیده شده کروماتین هائی با رنگ پذیری کم تا متوسط داشته اند و تعداد آنها نسبت به تعداد دیده شده توسط زریا و همکاران (۲۰۰۷) بیشتر می باشد. اٹوزینوفیل ها با اندازه ای کوچک تر از مونوسیت ها و کمی بزرگ تر از نوتروفیل ها با گرانول هایی بزرگ تر اندازه گیری شدند. در گونه فیل ماهی میانگین اندازه اٹوزینوفیل ها با کمینه ۸/۷۷ و بیشینه ۱۴/۱۳ میکرومتر، در تاس ماهی ایرانی با کمینه ۹/۵۶ و بیشینه ۱۳/۹۸ میکرومتر، در شیب با کمینه ۸/۹۴ و بیشینه ۱۴/۲۶ میکرومتر، در ازون برون با کمینه ۱۱/۰۳ و بیشینه ۱۶/۴۴ میکرومتر و در تاس ماهی روسی با کمینه ۱۲/۹۳ و بیشینه ۱۴/۶۳ میکرومتر بوده است و این گمان وجود دارد که اندازه نسبی گلبول های

گرانولوسیتی ائوزینوفیلی با افزایش سن کاهش نسبی می یابد ولی از نظر آماری معنی دار نیست ($P > 0.05$). در سنجش با گزارش حامدی نهاوندی (۱۳۸۲) که اندازه ائوزینوفیل های تاس ماهی ایرانی را ۱۵/۰۰ میکرومتر گزارش نموده است همخوانی ندارد. اندازه ائوزینوفیل ها در تاس ماهی روسی نسبت به سایر گونه ها کمی بزرگ تر می باشد و از نظر آماری معنی دار است ($P < 0.05$). میانگین \pm انحراف معیار ارقام در جدول شماره ۳ آمده است.

میانگین تعداد ائوزینوفیل های فیل ماهی ۱۱/۷-۴/۴۰ درصد بوده است که با یافته های بهمنی و همکاران (۲۰۰۱) که ۱۳/۷-۶/۶ درصد گزارش کرده اند، همخوانی داشته و از نظر آماری معنی دار است ($P < 0.05$) و با گزارش پالیکووا و همکاران (۱۹۹۹) که ۴/۶-۳ درصد بوده است، همخوانی ندارد؛ اگرچه ایشان باور دارند که داده های آنها هماهنگی بسیاری با داده های پگاسو (۱۹۸۳) و جاکینکو (۱۹۸۰) دارد. در تاس ماهیان ایرانی میانگین ائوزینوفیل ها ۱۳/۷-۵/۶ درصد بوده است که با یافته های بهمنی و همکاران (۲۰۰۱) که ۶/۵-۲/۳ درصد بوده است همخوانی ندارد و اختلاف آن از نظر آماری معنی دار است ($P < 0.05$).

در شپ ها این مقدار ۸/۵-۲/۵ درصد بوده است که نخستین گزارش برای این گونه می باشد. در ازون برون ها ۵/۹-۸/۶ درصد بوده است و اگرچه پالیکووا و همکاران (۱۹۹۹) شمار ائوزینوفیل ها را ۴/۶-۳ درصد گزارش نموده اند ولی با یافته های ما همخوانی ندارد. در تاس ماهی روسی ۶/۶-۷/۴ درصد بوده است که نخستین گزارش برای این گونه است. میانگین \pm انحراف معیار ارقام فوق در جدول شماره ۱ آمده است.

بازوفیل های ماهیان خاویاری در رنگ آمیزی رومانوفسکی سلول هائی گرد با هسته یک بخشی با کروماتینی بسیار رنگ پذیرتر از دیگر گرانولوسیت ها و بسیار کمیاب بوده و در همه گونه ها دیده نشده است.

زینکل و همکاران (۱۹۹۱)، پالیکووا و همکاران (۱۹۹۹)، زژیا و همکاران (۲۰۰۷)، حامدی نهاوندی (۱۳۸۲)، نولز و همکاران (۲۰۰۸) و بهمنی و همکاران (۲۰۰۱) هیچ یک در ماهیان خاویاری بازوفیل گزارش نکرده اند که شاید کمپایی بسیار این گرانولوسیت و تعداد بیشتر نمونه های بررسی شده در پژوهش حاضر علت این اختلاف باشد.

در این مطالعه میانگین شمار بازوفیل های فیل ماهی ۰/۱ درصد و شپ ۱ درصد بوده است. میانگین ارقام ذکر شده در جدول شماره ۱ آمده است.

لنفوسیت های ماهیان خاویاری در رنگ آمیزی رومانوفسکی سلول هائی هستند کوچک، متوسط و نیز بزرگ و گرد که بیشترین نسبت هسته به سیتوپلاسم را داشته اند، کروماتین آنها بسیار رنگ پذیر بوده و

در این مطالعه به فراوانی بسیار در نمونه های خونی دیده شدند که با یافته های زینکل و همکاران (۱۹۹۱)، پالیکووا و همکاران (۱۹۹۹)، زژیا و همکاران (۲۰۰۷) و حامدی نهاوندی (۱۳۸۲) همخوانی دارد.

در شناسائی نفوسیت های متوسط با توجه به الگوهای شناسائی نفوسیت های ماهیان خاویاری در جدیدترین منابع و همچنین با توجه به میانگین اندازه های نفوسیت ها در یافته های زینکل و همکاران (۱۹۹۱)، پالیکووا و همکاران (۱۹۹۹) و زژیا و همکاران (۲۰۰۷) در این مطالعه نیز تنها نفوسیت های کوچک و بزرگ مشاهده گردید و باور داریم که گزارش حامدی نهاوندی (۱۳۸۲) از نفوسیت های متوسط در تاس ماهی ایرانی با استفاده از روش رومانوفسکی دقت کمتری از داده های به دست آمده در پژوهش حاضر با استفاده از رنگ های سیتو شیمیایی دارد. نفوسیت های کوچک با حلقه ای از سیتوپلاسم آبی رنگ پیرامون هسته و نفوسیت های بزرگ با نواری پهن از سیتوپلاسم در اطراف هسته تنها گروه های نفوسیتی شناسائی شده بوده اند. نفوسیت ها اندازه ای کوچک تر از سایر سلول ها داشتند. در گونه فیل ماهی میانگین اندازه نفوسیت با کمینه $4/85$ و بیشینه $6/42$ میکرومتر، تاس ماهی ایرانی با کمینه $5/45$ و بیشینه $7/70$ میکرومتر، شپ با کمینه $4/81$ و بیشینه $6/34$ میکرومتر، ازون برون با کمینه $5/38$ و بیشینه $6/53$ میکرومتر و تاس ماهی روسی با کمینه $6/07$ و بیشینه $7/30$ میکرومتر بوده است. میانگین \pm انحراف از معیار این ارقام در جدول شماره ۴ آمده است.

میانگین شمار نفوسیت های فیل ماهی در این مطالعه $32/6-50/0$ درصد بوده است که با یافته های بهمنی و همکاران (۲۰۰۱) که $54/5-67/5$ درصد گزارش کرده اند، همخوانی ندارد و از نظر آماری معنی دار است ($P<0/05$).

پالیکووا و همکاران (۱۹۹۹) شمار نفوسیت ها را $68-73$ درصد گزارش کرده اند که با پژوهش حاضر همخوانی ندارد. ایشان باور دارند که یافته هایشان از داده های پگاسو (۱۹۸۳) و بادنکو و تشیچاتچوا (۱۹۸۴) بیشتر بوده است و گرشانوویچ و همکاران (۱۹۸۷) اندازه ای کمتر از آنها (۳۵ درصد) گزارش کرده اند که گزارش های اخیر با پژوهش ما همخوانی داشته است.

در تاس ماهی ایرانی $44/6-59/74$ درصد بوده است که با یافته های بهمنی و همکاران (۲۰۰۱) که $72/3-82/7$ درصد بوده همخوانی ندارد. در شپ $42/5-51/8$ درصد بوده است که نخستین گزارش از این گونه می باشد. در ازون برون ها $38/4-50/3$ درصد بوده است که با یافته های پالیکووا و همکاران (۱۹۹۹) که $68-73$ درصد بوده، همخوانی ندارد. ایشان باور دارند که یافته هایشان از داده های پگاسو (۱۹۸۳) و بادنکو و تشیچاتچوا (۱۹۸۴) بیشتر بوده است و گرشانوویچ و همکاران (۱۹۸۷) اندازه ای کمتر از آنها (۳۵ درصد) گزارش کرده اند که با یافته های این پژوهش همخوانی ندارد. این مقدار در تاس ماهی روسی

۵۵/۲-۵۶/۰ درصد بوده است که نخستین گزارش برای این گونه است. میانگین \pm انحراف از معیار ارقام ذکر شده در جدول شماره ۱ آمده است.

مونوسیت های ماهیان خاویاری در رنگ آمیزی رومانوفسکی سلول هائی بزرگ هستند که دارای واکوئل های آشکار گرد و سیتوپلاسم فراوان و گسترده می باشند. این سلول ها بزرگ ترین سلول های خونی هستند.

میانگین اندازه مونوسیت ها در فیل ماهی با کمینه ۱۳/۱۱ و بیشینه ۱۸/۳۹ میکرومتر، تاس ماهی ایرانی با کمینه ۹/۶۰ و بیشینه ۱۶/۲۶ میکرومتر، شپ با کمینه ۱۱/۰۱ و بیشینه ۱۴/۲۵ میکرومتر، ازون برون با کمینه ۱۳/۳۳ و بیشینه ۱۳/۹۳ میکرومتر و تاس ماهی روسی با کمینه ۱۴/۱۵ و بیشینه ۱۷/۰۱ میکرومتر دیده شده. این یافته ها با یافته حامدی نهاندی (۱۳۸۲) که ۱۸/۷۵ میکرومتر در تاس ماهی ایرانی است تنها در فیل ماهی نزدیک است و پالیکووا و همکاران (۱۹۹۹) در این مورد گزارشی ارائه ننموده اند. میانگین \pm انحراف معیار این ارقام در جدول شماره ۵ آمده است.

میانگین شمار مونوسیت های فیل ماهی ۳/۵-۸/۳ درصد بوده است که با یافته های بهمنی و همکاران (۲۰۰۱) که ۰/۶-۳/۲ درصد گزارش کرده اند و با یافته های پالیکووا و همکاران (۱۹۹۹) که ۲-۰/۷ درصد بوده، همخوانی ندارد. در تاس ماهی ایرانی ۳/۸-۷/۲ درصد بوده است که با یافته های بهمنی و همکاران (۲۰۰۱) همخوانی ندارد.

در شپ ها ۳/۳-۵/۰ درصد بوده است که نخستین گزارش از این گونه بوده است. در ازون برون ها این مقدار ۲/۵-۳/۷ درصد بوده که با یافته های پالیکووا و همکاران (۱۹۹۹) که ۲-۰/۷ گزارش کرده، همخوانی ندارد ($P>0/05$). در تاس ماهی روسی ۵/۵-۵/۷ درصد بوده که نخستین گزارش از این گونه بوده است. میانگین \pm انحراف معیار ارقام فوق در جدول شماره ۱ آمده است.

در گذشته پژوهش هائی چند بر ویژگی های سیتوشیمیائی سلول ها و اجدا آنها در ماهیان به انجام رسیده است که بسیار پراکنده بوده، کمتر از سوی یک پژوهنده یا یک کار گروهی پژوهشی انجام شده و همچنین پیوستگی هدفمند چنین پژوهش هائی از سوی پژوهشگران بسیار کمیاب بوده است.

در پژوهش حاضر ما واکاوی گسترده ای از ویژگی های سیتوشیمیائی گلبول های سفید را در گروهی از ماهیان خاویاری به انجام رسانیده ایم و برای افزایش ارزش کاربرد، شگردهای رایج را با شگردهای شیمیائی سنجیده ایم. از دیگر سو یافته هائی را فراهم آورده ایم که با کاربرد آنها بتوان هرچه بیشتر و با درستی هرچه افزون تر شناسائی و توانایی گلبول های سفید خونی را از دیدگاه خون شناسی شناخت و از نظر ایمنی شناسی توانایی آنها را بررسی کرد.

از آن رو که پژوهش های به انجام رسیده درباره ماهیان خاویاری و به ویژه ماهیان خاویاری دریای خزر بسیار کمیاب و انگشت شمار بوده است ، برآنیم که از پژوهش های به انجام رسیده و پذیرفتنی که بر روی نزدیک ترین گروه های ماهیان در گذشته به انجام رسیده بهره گرفته و یافته های خویش را با گزارشات دیگر محققین بسنجیم .

گرانولوسیت ها کارکرد ویژه ای در پاسخ های ایمنی خودکار دارند چرا که در پاسخ به میکروب ها با داشتن آنزیم هائی ویژه خود کارآمدی دوچندان می یابند (۸۸ ، ۳۴ ، ۲۸) . پراکسیدازها و یون های هالوژنی که در واکوئول های لکوسیتی آشکار می گردند در آسیب رسانی به باکتری ها کارکرد خود را تا عالی ترین مهره داران همچنان دارا می باشند . از این روست که توان پراکسیداز نشانه ای از پرتوانی و کارآمدی یاخته های بیگانه خوار در برابر میکروب ها به شمار می رود (۲۸ ، ۷۲ ، ۸۹ ، ۳۴ ، ۸۸) .

هتروفیل ها و نوتروفیل ها و شاید برخی دیگر از یاخته های گرانولوسیتی با داشتن چنین توانی، محافظت در برابر آسیب های میکروبی و مقابله در برابر بیماری ها را ایجاد می کنند (۲۸ ، ۷۲ ، ۸۹ ، ۳۴ ، ۸۸) .

فسفاتاز قلیائی و اسیدی آنزیم هائی لیزوزومی هستند که در روند بیگانه خواری لکوسیت های دستگاه ایمنی رها شده و به میکروب ها آسیب می رساند (۲۸ ، ۷۲ ، ۸۹ ، ۳۴ ، ۸۸) .

بتا گلوکورونیداز یکی از آنزیم های لیزوزومی است که یک هیدرولیز کننده گلیکوزیدها به شمار می رود. در مهره داران عالی، نوتروفیل ها و شماری از لنفوسیت های تیموسی و خونی و چندی از وابستگان لنفوسیت های B نیز چنین آنزیمی را دارند (۲۸ ، ۷۲ ، ۸۹ ، ۳۴ ، ۸۸) .

استرازها خانواده هائی از آنزیم ها هستند که در بسیاری از یاخته های خونی با نیا های گوناگون یافت می شوند. از این رو این آنزیم ها را استراز اختصاصی نامگذاری نموده اند چرا که نفتول AS – D کلرواستات استراز بسیار ویژه تر از آنزیمی چون پراکسیداز بوده و برای شناسائی لکوسیت های پستانداران به ویژه نوتروفیل های آنان کاربردی بی جایگزین دارد و در برابر استرازهای غیر اختصاصی چون نفتیل استات استراز و آلفا نفتیل بوتیرات استراز چندان ویژه نیستند (۲۸ ، ۷۲ ، ۸۹ ، ۳۴ ، ۸۸) .

درباره سودان بلک بی که گرایش بسیاری به چربی ها و فسفولیپیدها در غشاء گرانول های سیتوپلاسمی دارند ، باور بر این است که الگوی رنگ آمیزی آنها در راستای داشتن توان میلوپراکسیداز می باشد چرا که در رنگ آمیزی میلوپراکسیداز سلول هائی که پیشتر با سودان بلک بی رنگ پذیرفته اند همواره رنگ پذیر خواهند بود (۲۸ ، ۷۲ ، ۸۹ ، ۳۴ ، ۸۸) .

رنگ آمیزی پرئودیک اسید شیف ، گلیکوژن ها و گلیکوپروتئین هائی که در روند رسیدگی هرچه بیشتر یاخته های لکوسیتی به بار می آیند و فزونی می گیرند را رنگ می کند چرا که انباشت گلیکوژنی همواره پدید می آید . درباره لکوسیت ها باور بر این است که نیاز بسیار یاخته های بیگانه خوار به انرژی برون زاد و نیز درون زاد آنچنان است که برداشت، ساخت و انباشت گلیکوژن های سیتوپلاسمی بازتابی از کارکرد و توان بیگانه ستیزی آنها به شمار می رود (۲۸ ، ۷۲ ، ۸۹ ، ۳۴ ، ۸۸) .

نوتروفیل های ماهیان خاویاری با واکنش در برابر سودان بلک بی، پرئودیک اسید شیف و پراکسیداز و رنگ ناپذیری در برابر اسید فسفاتاز، آلفا نفتیل استات استراز و بتا گلوکوروئیداز شناسائی می گردند. اگرچه واکنش ناپایدار و ناهمسان کمی از سوی تاس ماهی ایرانی در رنگ آمیزی نفتول AS – D استات استراز دیده شد . دیگر گونه های بررسی شده و بیشتر نوتروفیل های انگشت قد، یک سال، پنج سال و یازده سال واکنش ناپذیر بودند که نگارنده بر این باور است که ناهمانندی در رنگ پذیری نوتروفیل های ماهیان خاویاری نسبت به مهره داران عالی یک ویژگی فیلوژنتیک است. ویژگی رنگ پذیری سیتوشیمیایی سلولهای فوق در جدول شماره ۶ آمده است .

در الاسموبرانش ها گرانولوسیت های نوتروفیلیک در رنگ آمیزی سودان بلک بی بررسی نشده است، در رنگ آمیزی پرئودیک اسید شیف واکنش مثبت و بسیار گزارش شده و تنها یک گزارش از واکنش ناپایدار در دسترس است (۳۹، ۸۶).

هاین و وین (۱۹۸۸) در بررسی سیتوشیمیائی نوتروفیل های *A. brevirostrum* دو نوع گرانول میله ای و بزرگ یافته اند که هر دو با پرئودیک اسید شیف واکنش مثبت داشتند. زینکل و همکاران (۱۹۹۱) در بررسی *A.transmutanus* و پالیکووا و همکاران (۱۹۹۹) در بررسی *Huso huso A.baerii* و *A.stellatus* که گرانولوسیت های ائوزینوفیلیک و نوتروفیلیک را یافته اند ، گزارشی از چگونگی واکنش با پرئودیک اسید شیف ندارند. نگارنده بر این باور است که واکنش مثبت با پرئودیک اسید شیف ویژگی گونه های ماهیان خاویاری در خانواده *Acipenseridae* می باشد. پس نوتروفیل ها بیگانه خوار حرفه ای این ماهیان به شمار آمده و شاید تنها بیگانه خوار حرفه ای و لکوسیتی این گروه از ماهیان باشد.

در ماهیان استخوانی گرانولوسیت های نوتروفیلیک و هتروسیت ها و گاهی گرانولوسیت های هتروفیل مانند گزارش شده اند که در واکنش با سودان بلک بی مثبت و در واکنش با پرئودیک اسید شیف واکنش پذیری معمول تا شدید داشته اند (۱۳، ۳۳، ۱۰۴، ۹۰، ۹۲، ۹۳، ۹۴، ۷۲، ۹۵).

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می دهد که واکنش پذیری با سودان بلک بی و پرئودیک اسید شیف در گرانولوسیت های هتروفیلیک و نوتروفیلیک در ماهیان یک واکنش همگانی است.

در الاسموبرانش ها بر پایه گزارش های در دسترس تنها هاین و وین (۱۹۸۶) در برخی از نوتروفیل ها واکنش کم پراکسیداز را یافته اند. ایشان در سال ۱۹۸۸ نیز در بررسی *A. brevirostrum* واکنش مثبت نوتروفیل ها را با پراکسیداز بار دیگر گزارش نموده اند که یافته های ما در این تحقیق را تأیید می نماید. واکنش مثبت با پراکسیداز در نوتروفیل ها و هتروفیل ها (۳۲، ۳۳، ۹۳، ۹۴، ۹۵، ۷۲) و واکنش ضعیف در نوتروفیل ها (۹۲) گزارش شده است. یافته های ما در این پژوهش درباره رنگ پذیری نوتروفیل های ماهیان خاویاری با ماهیان استخوانی نیز هماهنگ است پس پراکسیداز مثبت بودن برای نوتروفیل ها و هتروفیل های ماهیان یک ویژگی همگانی است.

واکنش گرانولوسیت های نوتروفیلیک و هتروفیلیک با اسید فسفاتاز مثبت و تنها گاهی در برخی از گونه ها ناپایدار گزارش شده. دیگر آنکه گرانول های بزرگ نوتروفیلی در سنجش با گرانول های رشته ای در واکنش با اسید فسفاتاز همواره منفی بوده اند. هاین و وین (۱۹۸۶) واکنش گرانولوسیت های نوتروفیلیک با نفتیل AS - D کلرواستات استراز را ناپایدار گزارش کرده اند.

گزارشی از واکنش نوتروفیل ها با رنگ بتا گلوکوروئیداز در دسترس نمی باشد. در ماهیان الاسموبرانش و خاویاری برای نخستین بار در پژوهش حاضر رنگ آمیزی بتا گلوکوروئیداز انجام شده است و گزارش می گردد و چون یافته ای در دسترس نیست نیاز به بررسی بیشتر دارد. با توجه به آنکه بتا گلوکوروئیداز از آنزیم های لیزوزومی به شمار می رود و گرانول های هتروفیل ها با آن کمی رنگ می گیرند نگارنده گمان دارد که ویژگی مولکولی این آنزیم آنچنان است که در روند شیمیایی موجود در کیت رنگ آمیزی بتا گلوکوروئیداز به کار رفته در این پژوهش نمی تواند رنگ پذیری خود را نشان دهد.

در شماری از پژوهش ها رنگ آمیزی با استیل ال تیروزین آلفا نفتیل استراز و توزیل ال لیزین آلفا نفتیل استراز و همچنین آلی استراز و آدنوزین تری فسفاتاز در آشکارسازی ویژگی های سیتوشیمیایی نوتروفیل ها و هتروفیل ها به کار رفته اند که واکنش کم تا بسیار را به بار آورده است. از آن رو که چنین رنگ آمیزی هائی در این پژوهش بر لکوسیت های ماهیان خاویاری انجام نشده نگارنده پیشنهاد می کند که این ویژگی های سیتوشیمیایی در یک پژوهش دیگر برای بررسی لکوسیت های گرانولوسیتی ماهیان خاویاری به کار برده شود.

واکنش مثبت با اسید فسفاتاز از سوی نوتروفیل های جوان و واکوئول دار (۳۲، ۳۳) و هتروفیل ها و نوتروفیل ها (۷۲) در ماهیان استخوانی دیده شده است که با یافته های ما همخوانی ندارد. با توجه به اینکه در گرانولوسیت های نوتروفیلیک ماهیان خاویاری بررسی شده، گرانول های میله ای و بزرگ به طور مشخص قابل مشاهده نبود، نگارنده گمان دارد که رنگ پذیری گرانول های میله ای گزارش شده از سوی هاین و وین (۲۰۰۶) و رنگ ناپذیری گرانول های بزرگ گزارش شده از سوی هاین و وین (۲۰۰۶) را

می توان از مشخصات گرانول هائی خاص از گرانولوسیت های نوتروفیلی و هتروفیلی ماهیان استخوانی و الاسموبرانش ها به شمار آورد .

واکنش نوتروفیل های ماهیان استخوانی با نفتول $AS - D$ کلرواستات استراز و آلفا نفتیل بوتیرات استراز توسط تریپاتی و همکاران (۲۰۰۴) منفی ولی واکنش این سلول ها توسط شیگدار و همکاران (۲۰۰۹) با نفتول $AS - D$ کلرواستات استراز مثبت گزارش شده است. چون بررسی این واکنش ها تنها در دو گونه در دسترس است نمی توان به درستی قضاوت و مقایسه انجام داد.

اٹوزینوفیل های ماهیان خاویاری در واکنش با پراکسیداز، واکنش نسبی با سودان بلک بی، واکنش نسبی کم با اسید فسفاتاز و آلفا نفتیل استات استراز و واکنش کم با پرئودیک اسید شیف و واکنش ناپذیری با بتا گلوکوروئیداز شناسائی می گردند. در واکنش با اسید فسفاتاز گونه تاس ماهی روسی و فیل ماهی زیر سه سال و در واکنش با آلفا نفتیل استات استراز تاس ماهی ایرانی زیر سه سال اٹوزینوفیل های واکنش ناپذیر داشتند که نگارنده بر این باور است که می توان این یافته را ویژگی گونه ای به شمار آورد.

در الاسموبرانش ها گرانولوسیت های اٹوزینوفیلیک در رنگ آمیزی های سودان بلک بی بررسی نشده است. در رنگ آمیزی پرئودیک اسید شیف گزارش هایی از واکنش پذیری بیش از گزارش های واکنش ناپذیری اٹوزینوفیل هاست و گهگاه گزارشی از واکنش پذیری ناپایدار یافت می شود. واکنش پذیری کم گرانول های اٹوزینوفیلیک در برابر پراکسیداز انگشت شمار است. در گزارش های در دسترس درباره ویژگی های رنگ پذیری اٹوزینوفیل های ماهیان خاویاری هیچیک به واکنش پذیری اٹوزینوفیل ها در برابر سودان بلک بی، پرئودیک اسید شیف و پراکسیداز نپرداخته اند مگر هاین و وین (۱۹۸۸) که واکنش ناپذیری گرانولوسیت های اٹوزینوفیلیک *A. brevirostrum* را گزارش کرده اند (۳۹، ۵۵، ۱۰۴).

از این رو چگونگی واکنش پذیری گزارش شده در این پژوهش برای گرانولوسیت های اٹوزینوفیلیک گونه های ماهیان خاویاری بررسی شده برای نخستین بار گزارش می گردد. از گزارش های در دسترس چنین بر می آید که در الاسموبرانش ها گرانولوسیت های اٹوزینوفیلیک در برابر اسید فسفاتاز همچون ماهیان خاویاری همواره واکنش پذیر بوده و تنها گاه واکنش پذیری ناپایدار بوده است و در ماهیان خاویاری اٹوزینوفیل ها در برابر فسفاتاز قلیائی نیز واکنش پذیر می باشند (۱۰۴). گزارش های نادر در دسترس درباره الاسموبرانش ها و ماهیان خاویاری واکنش پذیری در برابر استراز به ویژه آلفا نفتیل استات استراز و توزیل ال لایزین آلفا نفتیل استراز گزارش شده و هیچ گزارشی از چگونگی واکنش پذیری اٹوزینوفیل ها در برابر نفتول $AS - D$ کلرو استات استراز در این دو گروه از ماهیان در دست نیست و گزارش پژوهش حاضر نخستین گزارش در این باره می تواند باشد.

واکنش با بتا گلوکوروניداز در الاسموبرانش ها و ماهیان خاویاری انجام نشده و گزارشی از آن در دسترس نیست و داده های به دست آمده از پژوهش حاضر نخستین گزارش از این دست درباره ائوزینوفیل ها در ماهیان خاویاری می باشد. گزارش های پراکنده و نادری از واکنش ناپذیری گرانولوسیت های ائوزینوفیلیک در برابر رنگ آمیزی آمینوتریازول، سیانید آزید و آدنوزین تری فسفاتاز و همچنین رنگ پذیری در برابر لوکسول فست بلو در دسترس است (۴۰).

بر اساس یافته های پژوهش حاضر واکنش ناپذیری گرانولوسیت های ماهیان خاویاری در گونه های بررسی شده با سودان بلک بی، پراکسیداز و همچنین واکنش پذیری کم با پرئودیک اسید شیف می تواند یک ویژگی در ماهیان خاویاری باشد همچنان که در برابر بتا گلوکوروניداز هم می توان چنین اندیشید مگر آنکه پژوهش های دیگر نادرستی چنین فرضیه ای را نشان دهند.

درباره رنگ آمیزی اسید فسفاتاز بیان هرگونه وابستگی گونه ای در ماهیان خاویاری بررسی شده نادرست نخواهد بود چرا که همچون دیگر گونه های الاسموبرانش ها و ماهیان خاویاری در گونه هایی چون تاس ماهی روسی و فیل ماهی در نخستین سال های زندگی ائوزینوفیل ها واکنش ناپذیر بوده و سپس تا سال ها واکنش پذیر می مانند. این ویژگی درباره واکنش با آلفا نفتیل استات استراز نیز به چشم می خورد مگر آنکه تنها تاس ماهی ایرانی در نخستین سال های زندگی ائوزینوفیل واکنش ناپذیر داشته و پس از آن تا سال ها ائوزینوفیل های واکنش پذیر خواهد داشت. چنین داده هایی باعث می شود تا گمان ویژگی گونه ای رفتار ائوزینوفیل ها را هرچه بیشتر درست بدانیم. بر همین پایه همچون دیگر یافته های آزمایشگاهی درباره دیگر مهره داران که ویژگی های واکنش پذیری شیمیائی ائوزینوفیل ها در شناسائی گونه ها و نژادها به کار می روند پیشنهاد می گردد این ویژگی در شناسائی گونه ها، نژادها و دورگه های ماهیان خاویاری و یا بررسی وابستگی بوم شناختی ماهیان خاویاری به کار برده شود (۲۸، ۸۸).

گزارش یافتن ائوزینوفیل ها در ماهیان استخوانی بیش از گزارش نیافتن آن است، در گزارش هایی که ویژگی های سیتوشیمیائی ائوزینوفیل ها بررسی شده است، واکنش پذیری در برابر سودان بلک بی و اسید فسفاتاز و بتا گلوکوروניداز آزموده نشده و یا گزارشی از آن در دسترس نیست. در تنها گزارش در دسترس، ائوزینوفیل ها در برابر نفتول $AS - D$ کلرو استات استراز واکنش پذیر بوده اند (تریپاتی، ۲۰۰۴). برآیند گزارش های در دسترس از واکنش پذیری گرانولوسیت های ائوزینوفیلیک ماهیان استخوانی نشانگر آن است که این سلولها در برابر آلفا نفتیل استات استراز همواره واکنش ناپذیر و در برابر پراکسیداز بیشتر واکنش ناپذیر و گاه واکنش پذیر بوده و همچنین در برابر رنگ های پرئودیک اسید شیف و فسفاتاز قلیائی نیز نمی توان میان گزارش های نشانگر واکنش پذیری و گزارش های دیگر نشان دهنده واکنش ناپذیری برتری داد (۹۲، ۹۳، ۹۴، ۹۵، ۹۶، ۷۲، ۹۰).

در پژوهش حاضر به رنگ پذیری در برابر فسفاتاز قلیائی پرداخته ایم. در برابر رنگ پذیری ائوزینوفیل ها با اسید فسفاتاز نخستین گزارش برای ماهیان خاویاری می باشد. نگارنده گمان دارد واکنش پذیری کم ائوزینوفیل ها در برابر آلفا نفتیل استات استراز را می توان نشان دهنده جایگیری ائوزینوفیل های ماهیان خاویاری در میانه راه تکاملی الاسموبرانش ها و ماهیان استخوانی به شمار آورد.

واکنش ناپذیری ائوزینوفیل ها در برابر بتا گلوکورونیداز در این پژوهش تنها گزارش در دسترس از این دست در ماهیان خاویاری و افزون بر آن در ماهیان استخوانی می باشد که نیاز به بررسی بیشتر در دیگر ماهیان استخوانی دارد. همچنین واکنش پذیری این سلول ها در ماهیان خاویاری با پرئودیک اسید شیف با گزارش های در دسترس درباره دیگر ماهیان استخوانی چنین می نماید که افزون بر هماهنگی داده های این پژوهش با دیگر پژوهش ها شاید بتوان چنین گفت که در ماهیان استخوانی رنگ پذیری کم یا بسیار ائوزینوفیل ها با پرئودیک اسید شیف یک ویژگی همگانی باشد که در الاسموبرانش ها کمتر به چشم می خورد.

بنا بر آنچه گفته شد نگارنده گمان بر این دارد که واکنش پذیری ائوزینوفیل ها در برابر سودان بلک بی، پراکسیداز و پرئودیک اسید شیف نشانگر آن است که یاخته های ائوزینوفیلیک لکوسیت های جایگزین گرانولوسیت های نوتروفیلیک با توان بیگانه خواری در این ماهیان می باشد. واکنش ائوزینوفیل های ماهیان خاویاری با آنزیم های لیزوزومی همچون اسید فسفاتاز و آلفا نفتیل استات استراز این گمان را بیشتر می سازد. پس می توان ائوزینوفیل ها را یک بیگانه خوار غیر حرفه ای به شمار آورد.

لنفوسیت های ماهیان خاویاری در واکنش پذیری با اسید فسفاتاز و نفتول $AS - D$ استات استراز و واکنش ناپذیری با سودان بلک بی، پراکسیداز، پرئودیک اسید شیف، بتا گلوکورونیداز و آلفا نفتیل استات استراز شناسائی می گردند.

واکنش ناپذیری در برابر پرئودیک اسید شیف و بتا گلوکورونیداز در همه گونه های ماهیان خاویاری بررسی شده در سنجش با واکنش پذیری نسبی مهره داران عالی نگارنده را بر این باور می دارد که این یافته می تواند ویژگی فیلوژنتیک ماهیان خاویاری باشد.

داده های در دسترس درباره ویژگی های سیتوشیمیائی لنفوسیت های الاسموبرانش ها و ماهیان خاویاری کمیاب است؛ از این رو نمی توان انگاره درستی از چگونگی دگرگونی های تکاملی الاسموبرانش ها، ماهیان خاویاری و پس از آنها ماهیان استخوانی فراهم آورد. در تنها گزارش در دسترس از ویژگی های سیتوشیمیائی لنفوسیت های الاسموبرانش ها، استوسکوف (۲۰۰۰) نشان داده است که لنفوسیت ها با پرئودیک اسید شیف واکنش کم و گرانول های لنفوسیتی در آلی استراز واکنش خوبی دارند. لنفوسیت های ماهیان استخوانی در رنگ آمیزی بتا گلوکورونیداز واکنش پذیر، در پرئودیک اسید شیف شماری واکنش

پذیر و شماری واکنش ناپذیر و در اسید فسفاتاز همواره واکنش پذیر بوده اند. در واکنش با نفتول $AS - D$ کلرو استات استراز گروه های لنفوسیتی بررسی شده واکنش پذیر و نیز در برابر آلفا نفتیل استات استراز همواره واکنش پذیر می باشد. لنفوسیت های ماهیان استخوانی همواره در برابر پراکسیداز واکنش ناپذیر و تنها گروهی از آنها در برابر سودان بلک بی کمی واکنش پذیر بوده اند (۹۲، ۹۳، ۹۴، ۹۵، ۹۶، ۷۲).

گزارش هایی در دسترس است که نشانگر ناهمسانی واکنش پذیری لنفوسیت های ماهیان استخوانی در واکنش با آلفا نفتیل بوتیرات استراز می باشد (۹۲، ۹۳، ۹۴، ۹۵، ۹۶، ۷۲). اگرچه دشوار است که در گروه بزرگ ماهیان استخوانی یک یافته را به آسانی همگانی شمرد و یا به سادگی به ویژگی گونه ای آن چشم داشت و از آن رو که بسیاری از داده های به دست آمده در مورد ماهیان خاویاری تنها در این پژوهش فراهم آمده اند ارزیابی مقایسه داده ها به دشواری انجام پذیر است (۹۲، ۹۳، ۹۴، ۹۵، ۹۶، ۷۲).

برخی ویژگی های واکنش سیتوشیمیایی لکوسیت های ماهیان خاویاری که در این پژوهش گزارش می گردد نخستین گزارش برای ماهیان خاویاری می باشد. با ویژگی های یافت شده از ماهیان خاویاری که جایگاهی تکاملی میان الاسموبرانش ها و ماهیان استخوانی دارند چنین بر می آید که شاید واکنش ناپذیری لنفوسیت های ماهیان خاویاری در برابر بتا گلوکورونیداز ویژه این گروه از ماهیان است.

در واکنش پرئودیک اسید شیف، الاسموبرانش ها واکنش پذیری بسیار کم، ماهیان خاویاری بررسی شده واکنش ناپذیر و ماهیان استخوانی واکنش پذیری ناهمگون و ناپایدار داشته اند که باور به درستی این روند ویژه بودن این واکنشها را در ماهیان خاویاری تایید می کند.

گزارشی از ویژگی های واکنش پذیری لنفوسیت های الاسموبرانش ها در برابر اسید فسفاتاز در دست نیست و واکنش پذیری اسید فسفاتاز و نفتول $AS - D$ کلرو استات استراز در گونه های بررسی شده ماهیان خاویاری هماهنگ با دیگر گزارش های در دسترس از ماهیان استخوانی می باشد (۸۶، ۹۰).

درباره واکنش پذیری لنفوسیت های ماهیان الاسموبرانش در برابر سودان بلک بی و آلفا نفتیل استات استراز گزارشی در دسترس نیست، یافته های به دست آمده از واکنش ناپذیری لنفوسیت های ماهیان خاویاری بررسی شده در برابر سودان بلک بی و آلفا نفتیل استات استراز با گزارش های در دسترس از ماهیان استخوانی ناهمبندی بسیار دارد که می تواند نشانگر ویژگی ماهیان خاویاری و گرانول های لنفوسیتی آنها در رنگ پذیری سیتوشیمیایی با شیوه های یاد شده باشد. لنفوسیت های ماهیان استخوانی با پراکسیداز همانند لنفوسیت های ماهیان خاویاری واکنش پذیری نداشته و در این باره همانندی بسیار دارند و از آن رو که گزارشی از چگونگی واکنش پذیری لنفوسیت های الاسموبرانش ها در دست نیست نمی توان چگونگی روند تکاملی لنفوسیت ها در این ویژگی بیوشیمیایی را بیان نمود (۷۲، ۹۲، ۹۰).

نگارنده بر این باور است که لنفوسیت های ماهیان استخوانی از آن رو که واکنش پراکسیداز ندارند نمی توانند تنها با داشتن ویژگی بتا گلوکوروניداز و اسید فسفاتاز بیگانه خوار به شمار روند چرا که واکنش نداشتن پراکسیداز، بتا گلوکوروניداز و پرئودیک اسید شیف و واکنش با اسید فسفاتاز و در ماهیان خاویاری بررسی شده نیز درستی این گمان را دو چندان می کند و نشان دهنده آن است که توانائی آنزیمی پراکسیداز و فسفاتاز و بتا گلوکوروניداز کاربردهای دیگری در لنفوسیت ها داشته و بازتاب توانائی بیگانه خواری یا توان کشتار درون سیتوپلاسمی آنها نیستند و نبود گرانول ها یا کمیاب بودن گرانول های کوچک درون سیتوپلاسمی شناسائی شده در لنفوسیت های ماهیان نشان دهنده آن است که جایگاه های فیزیکی کشتار آنزیمی میکروب ها در درون سلول لنفوسیت ها نیز وجود ندارد. شاید بتواند گفت که تراوش و رهاسازی آنزیم ها از سوی لنفوسیت ها یک راهکار پذیرفتنی برای چگونگی آسیب رسانی این سلول ها بر یاخته های هدف باشد. شگرد سیتوشیمیائی شناخته نشده است که بتوان با کمک آن گروه های لنفوسیتی گوناگون را از یکدیگر بازشناخت. پیشنهاد می شود برای شناسائی اندازه گوناگونی لنفوسیت ها و چگونگی ویژگی های کارگری آنها در ماهیان به ویژه ماهیان خاویاری با استفاده از روش های ایمنولوژیک پژوهش گردد.

مونوسیت های ماهیان خاویاری با واکنش پذیری بسیار کم و ناهمسان و ناپایدار با بتا گلوکوروניداز و آلفا نفتیل استات استراز و واکنش ناپذیری آشکار در واکنش با سودان بلک بی، پرئودیک اسید شیف، اسید فسفاتاز، پراکسیداز و نفتول $AS - D$ استات استراز شناسائی می گردند. واکنش ناپذیری مونوسیت های ماهیان خاویاری با بتا گلوکوروניداز زیر سه سال و واکنش پذیری ناپایدار در گونه های تاس ماهی روسی و ازون برون در کنار واکنش آشکار گونه های فیل ماهی هفت ساله، شیپ نه ساله و تاس ماهی ایرانی یازده ساله نگارنده را بر این باور می دارد که واکنش پذیری مونوسیت ها در ماهیان خاویاری در سنجش با دیگر مهره داران عالی بسیار دیرتر پدید می آید. در برخی از گونه ها مثل ازون برون و تاس ماهی روسی این ویژگی بسیار زود (پیش از دو سالگی) و در برخی دیگر از ماهیان خاویاری بسیار دیرتر (تاس ماهی ایرانی، شیپ و فیل ماهی) پدید می آید.

واکنش ناپذیری مونوسیت های ماهیان خاویاری با آلفا نفتیل استات استراز در همه سن های گونه های فیل ماهی، تاس ماهی ایرانی، ازون برون و واکنش پذیری کم در تاس ماهی روسی یک ساله در سنجش با واکنش پذیری کم همه سن های شیپ این باور را در پژوهش حاضر که چگونگی واکنش در این رنگ آمیزی در ماهیان خاویاری یک ویژگی گونه ای به شمار می آید و در هم سنجی با دیگر مهره داران عالی گونه شیپ همانندی بسیار و دیگر گونه ها همچنان ناهمانند خواهد بود.

گزارش از واکنش پذیری مونوسیت های الاسموبرانش ها در برابر رنگ های سیتوشیمیائی کمیاب است. گزارش های در دسترس نشانگر آن است که مونوسیت ها در برابر پرئودیک اسید شیف واکنش

پذیری کم داشته و شماری از مونوسیت ها که گرانول دارند در برابر اسید فسفاتاز و آلی استراز واکنش پذیری کم نشان می دهند (۸۶). یافته های پژوهش پیش رو تنها داده های در دسترس و نخستین داده ها از این دست درباره واکنش پذیری سیتوشیمیائی مونوسیت های ماهیان خاویاری می باشد، از این رو دشوار است که در هم سنجی با داده های کم مونوسیت های الاسموبرانش ها چگونگی دگرگون پذیری این ویژگی ها در مونوسیت ها را به خوبی بازشناخت. در ماهیان استخوانی اندک داده های در دسترس نشانگر آن است که مونوسیت ها در واکنش با بتا گلوکوروניداز و اسید فسفاتاز همواره واکنش پذیر بوده و در رنگ آمیزی پراکسیداز گاه واکنش پذیر و گاه واکنش ناپذیرند و در روندی یکنواخت ندارند. بیش از همه ویژگی های سیتوشیمیائی دیگر مونوسیت ها در ماهیان استخوانی دارای توانایی آلفا نفتیل استات استراز می باشند و هیچیک از پژوهندگان پیشین واکنش پذیری مونوسیت ها در سودان بلک بی و پرئودیک اسید شیف را نیافته اند. شیگدار و همکاران (۲۰۰۹) نشان داده اند که مونوسیت ها در برابر آلفا نفتیل بوتیرات واکنش پذیر نمی باشند (۹۲، ۹۳، ۹۴، ۹۵، ۹۶، ۷۲، ۹۰).

بر پایه داده های به دست آمده پژوهش حاضر به نظر می رسد که ناتوانی مونوسیت های ماهیان خاویاری در واکنش با سودان بلک بی، پرئودیک اسید شیف و اسید فسفاتاز نابسندگی کارکردی مونوسیت ها در روندهای پاسخ ایمنی را به یاد می آورد. اگرچه داده هائی کافی از الاسموبرانش ها در دست نیست و افزون بر آن ناتوانی مونوسیت های ماهیان خاویاری بررسی شده در این پژوهش در واکنش با پراکسیداز، نفتول $AS - D$ ، گمان گفته شده را بیشتر در باور می آورد. شاید از این رو که نمونه های بررسی شده بیشتر در بر دارنده نمونه های به دست آمده از ماهیان زیر پنج سال بوده است بتوان چنین اندیشید که توانایی هایی هماهنگ با آنچه از مونوسیت های دیگر ماهیان استخوانی گزارش شده است پس از پنج سالگی یا کمی دیرتر و شاید در دوران رسیدگی جنسی ماهیان پدیدار گردد. سخت است باور داشت که مونوسیت های این ماهیان کارکردی شایسته و در خور بیگانه خوارهای تک هسته ای و عرضه کننده های آنتی ژن شناخته شده درباره مونوسیت های مهره داران عالی نداشته باشند. پیشنهاد می گردد ویژگی های یاخته های مونوسیتی ماهیان خاویاری در پژوهش دیگر بیشتر بررسی گردد.

بنابر این بطور خلاصه نوتروفیل های ماهیان خاویاری با واکنش در برابر سودان بلک بی، پرئودیک اسید شیف و پراکسیداز و رنگ ناپذیری در برابر اسید فسفاتاز، آلفا نفتیل استات استراز و بتا گلوکوروניداز شناسائی می گردند که نشاندهنده رسیدگی سلولها و توان بیگانه ستیزی و کار آمدی این سلولها در برابر میکروبها می باشد. اتوزینوفیل های ماهیان خاویاری در واکنش با پراکسیداز، واکنش نسبی با سودان بلک بی، واکنش نسبی کم با اسید فسفاتاز و آلفا نفتیل استات استراز و واکنش کم با پرئودیک اسید شیف و واکنش ناپذیری با بتا گلوکوروניداز شناسائی می گردند و در مقایسه با مطالب گفته شده نشان می دهد

اُوزینوفیلها توان کمی در بیگانه خواری دارند و انزیمهای لیزوزومی را به مقدار کم دارند و در بیگانه خواری می توانند جایگزین نوتروفیلها شوند.

لنفوسیت های ماهیان خاویاری در واکنش پذیری با اسید فسفاتاز و نفتول $AS - D$ استات استراز و واکنش ناپذیری با سودان بلک بی، پراکسیداز، پرئودیک اسید شیف، بتا گلوکوروئیداز و آلفا نفتیل استات استراز شناسائی می گردند که این یافته ها نشان می دهد این سلولها همانند لنفوسیت های پستانداران توان بیگانه خواری ندارند. برای تعیین نقش این یاخته ها در دستگاه ایمنی باید پژوهش های بیشتری انجام گیرد.

مونوسیت های ماهیان خاویاری با واکنش پذیری بسیار کم و ناهمسان و ناپایدار با بتا گلوکوروئیداز و آلفا نفتیل استات استراز و واکنش ناپذیری آشکار در واکنش با سودان بلک بی، پرئودیک اسید شیف، اسید فسفاتاز، پراکسیداز و نفتول $AS - D$ استات استراز شناسائی می گردند. گمان می رود عدم رنگ پذیری مونوسیت ها با بسیاری از روشهای رنگ آمیزی سیتوشیمیایی نشاندهنده عدم شرکت فعال این یاخته ها در پاسخ های ایمنی باشد که باید بیشتر بررسی گردد.

پیشنهادهات

پیشنهاد می شود شمارش تفریقی یاخته های سفید این گونه از ماهیان با روش های رنگ آمیزی اختصاصی هماتولوژیک انجام شود و اطلاعات گذشته تصحیح گردد.

شمارش تفریقی و چگونگی واکنشهای بیوشیمیایی یاخته های سفید گونه های دیگر این ماهیان و نیز گونه های وابسته به آنها انجام گردد.

برای شناسائی اندازه گوناگونی لکوسیت ها و چگونگی ویژگی های کارکردی آنها در ماهیان به ویژه ماهیان خاویاری با استفاده از روش های ایمونولوژیک پژوهش گردد.

برای شناسائی اندازه گوناگونی لنفوسیت ها و چگونگی ویژگی های کارکردی آنها در ماهیان به ویژه ماهیان خاویاری با استفاده از روش های ایمونولوژیک پژوهش گردد.

پیشنهاد می گردد ویژگی های یاخته های لکوسیتی بافت های ایمنی ماهیان خاویاری در پژوهش دیگر بیشتر بررسی گردد.

ویژگی های مولکول های ایمنی محلول و لکوسیتی بافت های ایمنی، خون و لنف ماهیان خاویاری در پژوهش دیگر بیشتر بررسی گردد.

ویژگی های مولکول های CD لکوسیتی بافت های ایمنی، خون و لنف ماهیان خاویاری در پژوهش دیگر بیشتر بررسی گردد.

فهرست منابع

منابع فارسی :

۱. بهمنی، محمود و کاظمی، رضوان و دانسکایا، پ (۲۰۰۵). ارزیابی کیفی تاس ماهی چندین ساله در شرایط پرورش مصنوعی. گزارش پایانی پروژه مشترک انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان و انستیتو Kasp NIRKH روسیه. انتشارات مؤسسه تحقیقات شیلات ایران. صفحه ۷۷.
۲. بهمنی، محمود (۱۳۷۷). بررسی فیلوژنیک و سیستماتیک تاس ماهیان. مجله علمی شیلات ایران. سال هفتم شماره ۲. صفحات: ۳۰-۹.
۳. حامدی نهاوندی، زبیده (۱۳۸۲). بررسی مقدماتی خون شناسی تاس ماهی ایران. مقالات پوستر اولین سمپوزیوم ملی ماهیان خاویاری. مجله علمی شیلات ایران. صفحه ۱۹۹.
۴. سرافراز، ژاله و اکبریان، محمد علی (۱۳۸۴). مروری بر بیولوژی ماهیان خاویاری خزر. انتشارات نقش مهر. صفحات: ۱۱۰-۱.
۵. مهبد، امیرسید علی (۱۳۷۹). اصول، کاربرد و تفسیر آزمایش ها در هماتولوژی. عملی نشر اشراقیه. چاپ دوم. صفحات: ۳۳۱ - ۳۱۶.
۶. نادری جلودار، مهدی و عبدلی، اصغر (۱۳۸۳). اطلس ماهیان حوزه جنوبی دریای خزر (آبهای ایران). انتشارات موسسه تحقیقات شیلات ایران. صفحات: ۵-۲.

7. Agrowal, A. (2000). Transposition and evolution of antigen – specific immunity. Science. 290; 1715 – 1716.
8. Ainsworth A.J.(1992).Fish granulocytes:Morphology,distribution and function.Annu.Rev.Fish Dis.2;123-148.
9. Allis A.E.(1977).The leukocytes of fish:A review.J.Fish.Biol.11;453–491.
- 10.Andreasen C.B., Latimer K.S.(1990). Cytochemical staining characteristics of chicken heterophils and eosinophils. Vet Clin Pathol.19;51–54.
- 11.Bahmani M., Kazemi R., Donskaya P.(2001). A comparative study of some hematological features in young reared sturgeons (*Acipenser persicus* and *Huso huso*).Fish physiology and biochemistry.24;135 – 140.
- 12.Baker D.W., Wood A.M, Litvak M.K, Kieffer J.D.(2005). Haematology of juvenile *Acipenser oxyrinchus* and *Acipenser brevirostrum* at rest and following forced activity. J. Fish .Bio. 66 ; 208–221.
- 13.Barber D.L. and Westermann J.E.M.(1977). Occurrence of the Periodic acid –Schiff positive granular leucocyte (PAS-GL) in some fishes and its significance . J.Fish. Biol. Vol:12 Issue 1;35-43.
- 14.Bartl S., Baltimore D., Weissman I.L.(1994). Molecular evolution of the vertebrate immune system.Proc.Natl.Acad.Sci.USA.PP: 10769–10770.
- 15.Bienzle D.(2000).Monocytes and macrophages in Feldman B.F. et al.(2000).Schalm's veterinary hematology.5thed.Lippincott William&Wilkins.PP:318–326.
- 16.Blaxhall P.C.(1972). The haematological assessment of the health of freshwater fish: a review of selected literature.J. Fish. Biol.4;593 –604.
- 17.Blaxhall P.C. and Daisley K.W.(1973). Routin hematological methods for use fish blood . J. fish. Bio.5;771-772.
- 18.Campbell T.W.(1988). Avian Hematology and Cytology. The Iowa state university press,Ames,Iowa ,USA,p:101.
- 19.Campbell T.W.and Ellis C.K.(2007). Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology. 3th ed.Blackwell Publishing, PP: 93– 113.
- 20.Catton W.T.(1951). Blood cell formation of certain teleost fishes. Blood.6; 39 –60.
- 21.Caxton–Martins A.E.(1978). Cytochemical studies of cell population in peripheral blood smear of two west african teleosts. J.Anat.128, 2;269–276.
- 22.Day M.J.(2000). Biology of lymphocytes and plasma cells in: Feldman B. F.et al.(2000). Schalm's veterinary hematology. 5th ed. Lippincott William & Wilkins. PP : 240 – 246.

23. Dean. G. A. (2000). CD antigens and immunophenotyping.in: Feldman B.F.et al.(2000). Schalm's veterinary hematology. 5th ed.Lippincott William&Wilkins.PP: 689–696.
24. Dixon B.,Van Erp S.H.M., Rodrigues P.N.S., Egberts E., Stet R.J.M.(1995). Fish major histocompatibility complex genes: an expansion. Dev.Comp.immunol.19;109–133.
25. Drastichova J.E., Svestková V.L. and Svobodová Z.(2005). Cytochemical study of carp neutrophil granulocytes after acute exposure to cadmium .J.APPL. Ichthyol.21;215– 219.
26. Fange R.(1992). Fish blood cells.In:Hoar W.S., Randall D.J., Farrel A.P., Fish physiology. The cardiovascular system.San Diego: Academic Press,12(B):1 –54.
27. Fange R.(1994). Blood cells, haemopoiesis and lymphomyeloid tissues in fish .Fish and shellfish immunology. 4;405–411.
28. Feldman B.F., Zinkl J.G., Jain N.C.(2000). Schalm's veterinary hematology. 5thed.Lippincott William&Wilkins.PP:1–1344.
29. Gentry P.A.(2000). Platelet biology, in Feldman B.F.et al (2000).Schalm's veterinary hematology.5thed.Lippincott William&Wilkins.PP:459 –466.
30. Gerstman B.B.and Cappucci D.T.(1986). Evaluating the reliability of diagnostic test results.J.A.V.M.A.188;248 –251.
31. Gisbert E. et al (1999) . Histochemistry of the development of the Digestive system of Siberian sturgeon during early ontogeny . Journal of fish Biology 55, 596- 616 .
32. Gravini. C., Martelli P.(1981). Alkaline phosphatase and peroxidase in goldfish (*Carassius auratus*) leukocytes.Basic.Appl. Histochem. 25(2);133 – 9.
33. Gravini C., Martelli P., Borelli B.(1981). Alkaline phosphatase and peroxidase in neutrophils of the catfish (*Ictalurus melas*) (*Rafinesque*) (*Siluriformes Ictaluridae*). Histochemistry.72(1) ;75 – 81.
34. Greer J.R., Foerrster J., Rodgers G., Paraskevas F., Glader B. (2003). Wintrobe's Clinical Hematology.11thed, Lippincott Williams & Wilkins.
35. Hale A.S and Ferlach J.A.(2000). Major histocompatibility complex antigens, in Feldman B.F.et al.(2000). Schalm's veterinary hematology.5thed.Lippincott William&Wilkins.PP:789 –795.
36. Handin R.I., Lux S.E., Stossel T.P.(2002). Blood principles and practice of Hematology.2nd ed .Lippincott Williams & Wilkins.
37. Hine P.M.(1990). Effect of size and temperature on the quantity of immunoglobulin in channel catfish,*Ictalurua Punctatus*.Vet. Immunol. Immunopathol.24;186 – 187.
38. Hine P.M.(1992). The granulocytes of fish.Fish and shellfish Immunology. 2;79-98.

- 39.Hine P.M and Wain J.M.(1986). The enzyme cytochemistry and composition of elasmobranch granulocytes. J.Fish Bio.Vol 30. Issue 4.P;465 – 475.
- 40.Hine P.M and Wain J.M.(1988).Ultrastructural and cytochemical observations on the granulocytes of the sturgeon *Acipenser brevirostrum*(Chondrostei). J.Fish Bio.Vol 3. Issue 2.P;235 – 245.
- 41.Holčík j.(1989).The Freshwater Fishes of Europe.AULA-Verlag Wiesbaden.PP:1-469.
- 42.Jain N.C.(1986). Schalm's Veterinary Hematology. 4th ed, Lea & Febsiger. Philadelphia.PP:1221.
- 43.Jain N.C.(1993).Essential of Veterinary Hematology.Lea & Febsiger. Philadelphia.PP:417.
- 44.Jakson M.L.(2007). Veterinary clinicalpathology an introduction. Blackwell Publishing.PP:1–363.
- 45.Jensen A.L.(2000). Validation of diagnostic tests in hematology laboratories, in Feldman B.F.et al.(2000). Schalm's veterinary hematology.5thed.Lippincott William&Wilkins.PP:20 – 28.
- 46.Knowles S., Hrubec T.C., Smith S.A., Bakal R.S. (2008). Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured shortnose sturgeon(*Acipenser brevirostrum*).Veterinary clinicalpathology Volume 35,Issue 4,P:434 – 440.
- 47.Louise B.D., Mills Westermann J.E.(1977). Occurrence of the Periodic acid Schiff positive granular leucocyte(PAS – GL) in some fishes and its significance.J.Fish Biol.Volum 12.Issue 1.PP:35 – 43.
- 48.Luer C.A., Walsh C.J., Bodine A.B., Wyffels J.T., Scott T.R. (1995). The elasmobranch thymus:Anatomical histological,and preliminary functional characterization.Journal of Experiment Zoology. 273;342-354.
- 49.Lund J.E.(2000). Toxicology effect on blood and bonemarrow, in : Feldman B.F, et al.(2000). Schalm's veterinary hematology. 5th ed. Lippincott William & Wilkins. PP:44 – 50.
- 50.Margi S.(1995). Veterinary Clinical Laboratory Procedures.Mosby.St.Louis.PP:28,29,30,58,59.
- 51.Mineev A.K.(2005). Morphological analysis and pathological changes in the structure of blood cell in fishes from Saratov Reservoir.Journal of Ichthyology.Vol 44. No 1; 87-93.
- 52.Montali R.J.(1988). Comparative pathology of inflammation in higher vertebrates(reptiles, birds and mammals).J.Comp.Pathol. 99 ; 1–26.
- 53.Noga E.J.(2000). Fish leukocyte responses,in:Feldman B.F,et al. (2000). Schalm's veterinary hematology. 5th ed. Lippincott William &Wilkins.PP : 433 – 442.

- 54.Ortiz–Delgado J.B.and Sarasq-uate C.(2004). Toxicity, Histopathological Alterations and Immunohistochemical CYPIA Induction in the Early Life Stages of the Seabream (*sporus aurata*) Following Water borne Exposuer to B(a)P and TCDD. Journal of Molecular Histology , Vol35 , NO1;51–60 .
- 55.Palikova M., Mare J., Jirasek J.(1999). Characteristics of leukocytes and thrombocytes of selected sturgeon species from intensive breeding.ACTA.VET.BRNO.68;259 – 264.
- 56.Perkins P.(2000). Hematologic abnormalities accompanying leukemia,in:Feldman B.F,et al.(2000). Schalm's veterinary hematology. 5th ed. Lippincott William & Wilkins. PP:740 –747.
- 57.Pilstrom L. and Dengten E.(1996). Immunoglobulin in fish – genes expression and structure.Fish and shellfish Immunology.6;243– 262.
- 58.Plier M. and MacWilliams P.(2000). Systemic mastocytosis and mast cell leukemia,in:Feldman B.F,et al.(2000). Schalm's veterinary hematology. 5th ed. Lippincott William & Wilkins. PP:747 – 755.
- 59.Raskin R.E. and Valenciano A.(2000). Cytochemical tests for diagnosis of leukemias, in:Feldman B.F,et al.(2000). Schalm' veterinary hematology. 5th ed.Lippincott William&Wilkins.PP:755– 765.
- 60.Raskin R.E. and Valenciano A. (2000). A Cytochemistry of normal leukocytes.In:Feldman B.F,et al.(2000).Schalm's veterinary hematology. 5th ed. Lippincott William & Wilkins.PP:337 – 346.
- 61.Reines B.P.(2000). Ontogeny of the hemopoietic system,in: Feldman B.F,et al. (2000). Schalm's veterinary hematology. 5th ed. Lippincott William&Wilkins.PP: 79 – 85.
- 62.Rice C.E.(1968). Comparative serology of domestic animals.Adv. Vet.Sci.12;105–162.
- 63.Rose N.R., and Friedman H.(1980). Manual of Clinical Immunology, 2nded.Washington D.C., American Society of Microbiology.
- 64.Rowley A.F., Ratcliffe N.A.(1988). Vertebrate blood cells. Cambridge University Press. PP:19 – 127.
- 65.Saunders D.C.(1966). Differential blood cell counts of 121 species of marine fishes of Puerto Rico.Trans.Am.Micros.Soc.85;427– 499.
- 66.Saunders D.C.(1966). Elasmobranch blood cells.Copeia,66;348- 351
- 67.Schneider A.(2000). Principles of blood collection and processing, in:Feldman B.F,et al.(2000). Schalm's veterinary hematology.5th ed. Lippincott William & Wilkins. PP:827 – 833.
- 68.Schultz R.D., and Adams L.S.(1978). Immunologic methods for detection of humoral and cellular immunity.Vet.Clin.North Am. Small.Anim.Pract.8;721 – 753.

- 69.Scott M.A.(2000). The hematologic effects of immunologic diseases,in:Feldman B.F,et al.(2000). Schalm's veterinary hematology. 5th ed. Lippincott William & Wilkins. PP : 51 – 56.
- 70.Scott M.A.(2000). Granulocytes and platlet antigens,in:Feldman B. F,et al.(2000). Schalm's veterinary hematology.5th ed.Lippincott William & Wilkins.PP:783 – 789.
- 71.Secombes C.J.(1994). Enhancement of fish phagocyte activity. Fish and Shellfish Immunol.4;421 – 436.
- 72.Shigdar S., Harford A.. Ward A.C.(2009). Cytochemical characterization of the leucocytes and thrombocytes from Murray cod(*Maccullchella Peelii pelii*,Mitchell).Fish and shellfish Immunology.Vol:26;731 – 736.
- 73.Sigma Aldrich,INC.(2008). Acid phosphatase,Leukocyte, procedure NO.181,St.Louis:Sigma diagnostics,Technical service.Revised 2003–09.www.Sigma –Aldrich.com .
- 74.Sigma Aldrich ,INC.(2008).β-glucoronidase ,Procedure NO.181, St.Louis:Sigma diagnostics,Technical service,Revised2003-09, www.Sigma–Aldrich.com .
- 75.Sigma Aldrich,INC.(2008). Periodic Acid –Shiff staining system, procedure NO.395,St.louis:Sigma diagnostice,Technical service , Revised 2003 – 09 ,www.Sigma –Aldrich.com.
- 76.Sigma Aldrich,INC.(2008). Sudan Black B staining system. procedure NO.380,St.Louis:Sigma diagnostice,Technical Service , Revised 2003–09,www.Sigma–Aldrich.com.
- 77.Sigma Aldrich,INC.(2008). Naphthol AS- D chloroacetate esterase and Naphthyl acetate esterase staining system,procedure NO.90,St.Louis:Sigma diagnostics,Technical service,Revised 2003–09,www.Sigma – Aldrich.com .
- 78.Sigma Aldrich,INC.(2008).Leukocyte peroxidase(Myeloperoxidase) Procedure No.390,St.Louis:Sigma diagnostics,Technical service, Revised 2003–09,www.Sigma–Aldrich.com.
- 79.Smith G. S.(2000). Neutrophils in:Feldman B.F,et al.(2000). Schalm's veterinary hematology. 5th ed.Lippincott William & Wilkins. PP : 281 – 297.
- 80.Smith S.A. and Hrubex T.C.(2000). Hematology of Fish,in: Feldman B.F,et al.(2000). Schalm's veterinary hematology.5th ed. Lippincott William & Wilkins. PP:1120 – 1126.
- 81.Smith M., Warmolts D., Thoney D., Hueter R.(2004).The Elasmobranch Husbandry Manual.Ohio Biological Survey . Inc.www.ohiobiological survey.org.

82. Stiffens III W.L.(2000). Ultrastructural feature of leukocytes,in: Feldman B.F,et al.(2000). Schalm's veterinary hematology. 5th ed. Lippincott William & Wilkins. PP : 326 – 337.
83. Stockham S. L.(2000). Hematologic changes due to bacterial infections,in:Feldman B.F,et al.(2000). Schalm's veterinary hematology. 5th ed. Lippincott William & Wilkins. PP : 38 – 43.
84. Stockham S. L. and Scott M. A. (2000). Basophils and mast cells in: Feldman B.F,et al.(2000). Schalm's veterinary hematology. 5th ed. Lippincott William & Wilkins. PP : 297 – 308.
85. Stockham S.L. and Scott M.A.(2002). Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology.Iowa State Press.PP:49–84.
86. Stoskopf M.J.(2000). Normal hematology of elasmobranchs,in: Feldman B.F,et al.(2000). Schalm's veterinary hematology.5th ed. Lippincott William & Wilkins.PP:1174–1179.
87. Sunyer O., Zarkadis I. K., Lambris J.D.(1998). Complement diversity:a mechanism for generating immune diversity.Immunol.Today. 19;519 – 523.
88. Thrall M.A., Baker D.C., Campbell T.W., DeNicola D.B., Fettman M.J., Lassen E.D., Rebar A., Weiser G.(2004). Veterinary Hematology and Clinical Chemistry.Lippincott Williams & Wilkins. PP:277 – 289.
89. Tizard I. R.(2000). Veterinary immunology an introduction. 6th ed. W.B.Saunders company.PP:1 – 482.
90. Tripathi N. K.,Latimer K.S., Burnley V.V.(2004). Hematologic reference intervals for koi(*Cyprinus carpio*),including blood cell morphology,cytochemistry and ultrastructure.Veterinary clinical Pathology.33(2);74–83.
91. Turgeon M.L.(2004). Clinical hematology,Theory and Procedures 4th ed, Lippincott Williams & Wilkins. 1–550.
92. Tavares–Dias M.(2005). Peripheral blood cells of the Armored catfish(*Hoplosternum littorale*(Hancock,1828):A morphological and cytochemical study.Braz.J.Morphol.Sci.22(4);215 – 220.
93. Tavares–Dias M.(2006). Cytochemical method for staining fish basophils.Journal of Fish Biology.68;312 – 317.
94. Tavares–Dias M.(2006). A morphological and cytochemical study of erythrocytes,thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts.Journal of Fish Biology.68;1822 – 1833.
95. Tavares–Dias M. and Moraes F.R.(2007). Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish(*Ictalurus punctatus* Raf),with an assessment of morphologic,cytochemical, and ultrastructural features.Veterinary clinical pathology.Vol.36.No.1;49– 54.

96. Tavares –Dias M., Ono E.A., Pilarski F., Moraes F.R.(2007). Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? A cytochemical study and ultrastructural analysis. *J. Appl. Ichthyol.* 23; 709 – 712.
97. Valenciano A. and Raskin R.(2000). Cytochemistry of Normal Leukocytes, in: Feldman B.F, et al.(2000). *Schalm's veterinary hematology*. 5th ed. Lippincott William & Wilkins. PP: 337 – 347.
98. War G.W.(1995). The immunoglobulin genes of fish. *Dev. Comp. Immunol.* 19; 1 – 12.
99. Williot P. et al (1993). A very brief survey of the status and prospects of freshwater sturgeon farming in Europe (EEC). *European Aquaculture society special publication*. No. 20; 32-36.
100. Young K.M.(2000). Eosinophils in: Feldman B.F, et al.(2000). *Schalm's veterinary hematology*. 5th ed. Lippincott William & Wilkins. PP: 297 – 308.
101. Young N.S., Gerson S.L., Higgs K.A.(2006). *Clinical Hematology*. Mosby. PP: 71-89, 348-795.
102. Zapata A.(1980). Ultrastructure of elasmobranch lymphoid tissue. I. Thymus and Spleen. *Developmental and comparative Immunology*. 4; 459-472.
103. Zexia G., Wang Weimin W., Yi Y., Abbas K., Dapeng L., Guiwei Z.(2007). Morphological studies of peripheral blood cells of the Chinese sturgeon, *Acipenser Sinensis*. *Fish Physiology. Biochem* 33; 213 – 222.
104. Zinkl J.G., Cox W.T., Kono C.S.(1991). Morphology and cytochemistry in leucocytes and thrombocytes of six species of fish. *Comp. Haematol. Int.* 1; 187 – 195.

پیوست

جدول ۱- شمارش افتراقی (%). گلبول های سفید خون گونه های تاس ماهیان بررسی شده با رنگ رومانوفسکی

نوع ماهی	سن	Neutrophil				Eosinophil				Basophil				Lymphocyte				Monocyte			
		Min	Max	Mean	Sd	Min	Max	Mean	Sd	Min	Max	Mean	Sd	Min	Max	Mean	Sd	Min	Max	Mean	Sd
A.n	6month	۳۷	۴۳	۳۹/۶	۱/۳۴	۶	۱۱	۸/۵	۱/۰۶					۴۵	۵۱	۴۷/۶	۱/۱۹	۳	۶	4/3	-/۶۳
	1Yr	۳۸	۴۴	۳۹/۸	۱/۰۲	۳	۶	۴/۷	۰/۴۷					۴۵	۴۹	۴۸/۳	۰/۷۵	۳	۵	4/3	-/۳۳
	2Yr	۳۶	۴۵	۴۱/۳	۱/۷۳	۱	۵	۲/۵	۰/۸۵					۴۵	۵۷	۵۱/۸	۲/۸۲	۲	۱۰	۴/۴	۱/۵۸
	3Yr	۳۰	۴۱	۳۵/۵	۱/۷۳	۵	۷	۴/۶	۳/۴۷					۳۸	۴۷	۴۲/۵	۱/۴۲	۳	۷	۵	-/۶۳
	9Yr	۳۷	۴۴	۴۰/۷	۱/۵۸	۵	۹	۶/۹	۰/۸			۱		۴۷	۵۲	۴۹/۱	۱/۱۵	۱	۱۰	۳/۳	۱/۷۳
H.h	6M	۴۵	۵۲	۴۸/۰	۱/۳۷	۶	۱۰	۸/۵	-/۸۵					۳۱	۳۹	۳۶/۷	۱/۷۳	۵	۹	۶/۸	-/۸۸
	1Yr	۴۲	۴۸	۴۴/۹	۱/۲۸	۵	۱۰	۷/۳۶	۱/۱۹					۳۱	۴۷	۳۹/۵	۳/۱۶	۲	۱۳	۸/۳	۲/۵۱
	2Yr	۳۵	۴۵	۴۰/۰	۱/۸۸	۷	۱۵	۱۰/۶	۱/۷۶					۴۱	۴۹	۴۵/۹	۱/۶۵	۱	۶	۳/۵	۱/۶۸
	3Yr	۴۳	۵۶	۵۰/۳	۲/۶۸	۱۰	۱۵	۱۱/۷	۱/۱۸			۰/۱		۲۳	۴۰	۳۲/۶	۳/۱۹	۱	۱۱	۵/۴	۱/۷۳
*	7Yr	۳۱	۴۹	۳۹/۱	۳/۵۶	۳	۹	۴/۴	۱/۲۸					۳۹	۶۱	۵۰/۰	۳/۸۰	۱	۹	۴/۵	۲/۲۵
A.p	6M	۲۹	۴۱	۳۹/۴	۲/۳۵	۶	۱۰	۸/۹	-/۶۹					۴۵	۵۰	۴۷/۳	-/۷۹	۴	۱۲	۶/۷	۱/۳۳
	1Yr	۲۷	۴۷	۳۸/۳	۳/۴۳	۳	۱۵	۷/۷	۲/۳۸					۳۹	۵۷	۴۶/۸	۲/۸۰	۳	۱۱	۷/۲	۲/۲۵
	2Yr	۲۲	۳۲	۲۹/۶	۲/۰۴	۳	۱۰	۶/۹	۱/۵۳					۵۱	۶۴	۵۴/۷	۲/۹۵	۱	۷	۳/۸	۱/۳۳
	3Yr	۳۵	۴۹	۴۱/۳	۳/۵۳	۳	۱۶	۸/۹	۲/۹۲					۳۸	۵۱	۴۴/۶	۳/۸۴	۲	۱۱	۵/۲	۲/۱
	5Yr	۳۲	۴۰	۳۵/۵	۱/۶۷	۱۰	۱۷	۱۳/۷	۱/۸۹					۴۵	۵۱	۴۷/۵	۱/۱۵	۱	۹	۳/۸	۱/۴
	11Yr	۳۹	۴۱	۴۰/۵	۰/۳۵	۴	۶	۵/۶	۰/۳۶					۴۷	۵۲	۴۹/۷	-/۷۹	۳	۶	۴/۲	-/۴۸
A.s	6M	۳۵	۴۲	۳۸/۴	۱/۷	۷	۱۱	۸/۸	۱/۰۳					۴۴	۵۴	۵۰/۳	۲/۳۴	۱	۵	۲/۵	۱/۱
	1Yr	۳۹	۵۰	۴۰/۱	۳/۸۱	۵	۱۶	۸/۶	۱/۸۶					۳۵	۴۸	۳۸/۴	۴/۳۱	۱	۶	۳/۷	۱/۲۳
	2Yr	۳۳	۴۹	۴۱/۹	۳/۳۷	۴	۱۶	۹/۵	۲/۷۲					۴۱	۵۴	۴۴/۹	۳/۰۸	۲	۶	۳/۷	-/۷۷
A.g	6M	۲۸	۳۹	۳۱/۹	۴/۴۳	۵	۱۱	۶/۶	۲/۳۷					۴۸	۵۹	۵۶/۰	۲/۵۷	۱	۹	۵/۵	۱/۷۳
	1Yr	۲۶	۳۵	۳۱/۷	۲/۴۵	۴	۱۲	۷/۴	۱/۷۶					۴۹	۶۲	۵۵/۲	۳/۳۳	۱	۱۲	۵/۷	۲/۴۰

A.n = *Acipenser nudipectus*

A.g = *Acipenser gueldenstaedtii*

A.s = *Acipenser stellatus*

A.p = *Acipenser persicus*

H.h = *Huso huso*

جدول ۲- بررسی اندازه نوتروفیل های گونه های تاس ماهیان بررسی شده (میکرومتر)

سن	<i>A. nudiventris</i>				<i>A. persicus</i>				<i>A. stellatus</i>				<i>A. gueldenstaedtii</i>				<i>H. huso</i>			
	Min	Max	Mean	Sd	Min	Max	Mean	Sd	Min	Max	Mean	Sd	Min	Max	Mean	Sd	Min	Max	Mean	Sd
6month	۷/۰۷	۱۱/۷۲	۹/۱۰	۱/۳۵	۹/۹۹	۱۴/۴۹	۱۱/۸۲	۱/۱۹	۶/۱۳	۱۲/۱۳	۸/۴۹	۱/۵۱	۷/۹۳	۱۲/۵۴	۹/۳۹	۱/۵۱	۷/۰۸	۱۲/۷۶	۱۱/۰۲	۱/۱۶
1Yr	۷/۰۶	۱۱/۳۰	۹/۵۱	۰/۶۷	۹/۱۷	۱۴/۲۰	۱۱/۲۱	۰/۹۱	۸/۸۴	۱۳/۲۹	۱۳/۲۸	۱/۴۶	۳/۱۳	۱۲/۹۱	۱۰/۴۳	۱/۸۶	۶/۲۸	۱۲/۷۸	۱۰/۳۰	۱/۴۱
2 Yr	۶/۸۲	۱۲/۰۱	۹/۴۳	۱/۱۵	۶/۹۱	۱۲/۸۹	۹/۰۰	۱/۷۳	۷/۳۷	۱۲/۲۵	۹/۳۹	۰/۴۹					۵/۳۱	۱۱/۷۸	۹/۱۳	۱/۴۸
3 Yr	۷/۲۰	۱۰/۴۲	۸/۴۴	۰/۶۲	۶/۱۱	۱۱/۷۳	۸/۱۴	۱/۰۸									۱۱/۱۵	۱۲/۴۱	۱۱/۵۹	۰/۰۶
4 Yr																				
5 Yr					۹/۰۵	۱۴/۹۸	۱۱/۹۷	۱/۱۳												
6 Yr																				
7 Yr																	۵/۶۷	۱۰/۸۶	۸/۴۴	۱/۴۲
8 Yr																				
9 Yr	۸/۶۵	۱۴/۴۵	۱۱/۰۵ (۱۱/۱۶)	۱/۵۹																
10 Yr																				
11 Yr					۷/۸۵	۱۲/۳۶	۹/۶۳	۱/۱۶												

جدول ۳- بررسی اندازه ائوزینوفیل های گونه های تاس ماهیان بررسی شده (میکرومتر)

سن	<i>A. nudiventris</i>				<i>A. persicus</i>				<i>A. stellatus</i>				<i>A. gueldenstaedtii</i>				<i>H. huso</i>			
	Min	Max	Mean	Sd	Min	Max	Mean	Sd	Min	Max	Mean	Sd	Min	Max	Mean	Sd	Min	Max	Mean	Sd
6month	۱۰/۸۷	۱۴/۳۶	۱۲/۳۹	۰/۶۶	۱۱/۸۲	۱۵/۳۰	۱۳/۵۸	۰/۷۵	۹/۴۲	۱۲/۷۲	۱۱/۰۳	۰/۵۲	۱۰/۱۷	۱۴/۹۰	۱۲/۹۳	۰/۹	۱۲/۱۹	۱۷/۲۸	۱۳/۸۸	۰/۹۲
1Yr	۱۱/۰۷	۱۳/۶۵	۱۱/۹۷	۰/۴۲	۱۱/۹۷	۱۶/۶۳	۱۳/۹۸	۰/۹۹	۱۲/۷۵	۱۳/۶۷	13/28	۰/۲۸	۱۰/۹۰	۱۹/۸۸	۱۴/۶۳	۱/۸۲	۱۰/۳۶	۱۵/۴۴	۱۲/۵۲	۰/۹۲
2 Yr	۱۱/۴۶	۱۲/۵۹	۱۲/۵۰	۰/۱۶	۷/۹۵	۱۲/۲۴	۹/۵۶	۰/۷۷	۱۶/۰۳	۱۶/۴۹	۱۶/۴۴	۰/۰۹					۱۲/۱۱	۱۷/۹۳	۱۴/۱۳	۱/۰۰
3 Yr	۷/۹۸	۸/۹۹	۸/۴۸	۰/۱۵	۸/۹۵	۱۳/۴۶	۱۰/۵۶	۱/۰۰									۱۲/۶۸	۱۷/۱۶	۱۴/۰۶	۰/۷۹
4 Yr																				
5 Yr					۹/۶۷	۱۷/۱۵	۱۳/۵۴	۱/۶۱												
6 Yr																				
7 Yr																	۶/۲۱	۱۱/۲۷	۸/۷۷	۰/۸
8 Yr																				
9 Yr	۱۳/۱۶	۱۵/۶۶	۱۴/۲۶	۰/۸۳																
10 Yr																				
11 Yr					۸/۲۱	۱۳/۶۲	۱۲/۲۷	۰/۹۵												

جدول ۴- بررسی اندازه لنفوسیت های گونه های تاس ماهیان بررسی شده (میکرومتر)

سن	<i>A. nudiventris</i>				<i>A. persicus</i>				<i>A. stellatus</i>				<i>A. gueldenstaedtii</i>				<i>H. huso</i>			
	Min	Max	Mean	Sd	Min	Max	Mean	Sd	Min	Max	Mean	Sd	Min	Max	Mean	Sd	Min	Max	Mean	Sd
6month	۴/۲۴	۶/۶۴	۵/۴۴	۱/۶۹	۴/۵۸	۵/۷۹	۵/۷۰	۰/۱۹	۵/۰۸	۸/۴۹	۶/۵۳	۰/۵۹	۴/۷۱	۸/۶۴	۶/۰۷	۰/۵	۶/۱۳	۶/۷۲	۶/۴۲	۰/۰۹
1Yr	۴/۰۷	۶/۳۴	۵/۲۱	۰/۳۵	۶/۰۴	۶/۶۹	۶/۲۸	۰/۰۶	۴/۲۰	۸/۳۹	۶/۳۳	۰/۶۶	۶/۰۹	۸/۹۳	۷/۳۰	۰/۶	۵/۱۳	۶/۹۷	۵/۸۳	۰/۳
2 Yr	۳/۵۴	۵/۹۶	۴/۸۱	۰/۵۹	۴/۴۰	۹/۸۳	۵/۹۸	۱/۱۱	۴/۲۴	۹/۳۲	۵/۳۸	۰/۹۸					۳/۳۱	۷/۳۸	۵/۴۹	۰/۷۲
3 Yr	۴/۰۸	۵/۹۹	۵/۰۵	۰/۳۰	۴/۴۲	۷/۴۶	۵/۴۵	۰/۹۵									۴/۰۷	۶/۸۸	۴/۸۵	۰/۳۲
4 Yr																				
5 Yr					۵/۴۴	۷/۸۹	۶/۶۶	۰/۳۸												
6 Yr																				
7 Yr																	۴/۱۶	۶/۵۶	۵/۳۷	۰/۴۵
8 Yr																				
9 Yr	۵/۳۷	۶/۹۲	۶/۳۴	۰/۲۶																
10 Yr																				
11 Yr					۵/۵۶	۶/۶۸	۵/۸۴	۰/۱۹												

جدول ۵- بررسی اندازه مونوسیت های گونه های تاس ماهیان بررسی شده (میکرومتر)

سن	<i>A. nudiventris</i>				<i>A. persicus</i>				<i>A. stellatus</i>				<i>A. gueldenstaedtii</i>				<i>H. huso</i>			
	Min	Max	Mean	Sd	Min	Max	Mean	Sd	Min	Max	Mean	Sd	Min	Max	Mean	Sd	Min	Max	Mean	Sd
6month	۱۱/۴۳	۱۶/۰۹	۱۴/۲۵	۱/۰۶	۱۴/۰	۱۸/۵۰	۱۶/۲۵	۰/۷۱	۱۳/۰۱	۱۳/۶۶	۱۳/۸۳	۰/۲۸	۱۲/۸۶	۱۵/۴۴	۱۴/۱۵	۰/۴	۱۸/۰۰	۱۸/۰۹	۱۸/۰۴	۰/۰۴
1Yr	۱۱/۶۲	۱۵/۴۱	۱۳/۶۶	۰/۶۰	۱۲/۲۲	۱۳/۶۷	۱۳/۲۳	۰/۲۴	۱۳/۴۳	۱۴/۴۳	۱۳/۹۳	۰/۱۵	۱۳/۰۹	۱۹/۶۷	۱۷/۰۱	۱/۱۲	۱۴/۸۹	۱۶/۵۶	۱۵/۴۵	۰/۲۷
2 Yr	۱۲/۴۲	۱۳/۴۴	۱۲/۹۳	۰/۱۶	۸/۳۵	۹/۶۹	۹/۶۰	۰/۲۸	۱۳/۲۴	۱۴/۶۳	۱۳/۳۳	۰/۲۹					۱۸/۱۹	۱۸/۴۹	۱۸/۳۹	۰/۱۵
3 Yr	۱۱/۲۹	۱۳/۴۵	۱۲/۷۷	۰/۳۶	۱۰/۸۸	۱۴/۶۸	۱۳/۵۶	۰/۷									۱۳/۷۲	۱۷/۰۵	۱۵/۴۶	۰/۵۲
4 Yr																				
5 Yr					۹/۳۷	۱۰/۷۵	۹/۹۹	۰/۲۱												
6 Yr																				
7 Yr																	۱۱/۳۳	۱۵/۰۴	۱۳/۱۱	۰/۸۱
8 Yr																				
9 Yr	۱۰/۹۲	۱۳/۴۰	۱۱/۰۱	۰/۵۳																
10 Yr																				
11 Yr					۱۰/۳۸	۱۳/۴۲	۱۱/۱۰	۰/۵۴												

جدول ۶- بررسی سیتوشیمیائی گونه های تاس ماهیان بررسی شده

		<i>A. persicus</i>						<i>A. stellatus</i>			<i>A. gueldenstaedtii</i>		<i>A. nudiventris</i>						<i>H.huso</i>				
		6mon	1Yr	2 Yr	3 Yr	5 Yr	11 Yr	6mon	1Yr	2 Yr	6mon	1Yr	6mon	1Yr	2 Yr	3 Yr	9 Yr	6mon	1Yr	2 Yr	3 Yr	7 Yr	
SBB	Neut	+	+	+	+	+	w	+	w	w	+	w	+	+	+	+	w	+	+	+	+	w	
	EO	+	w	+	w	w	w	+	w	w	+	-	+	+	w	w	w	+	+	+	-	-	
	Lym																						
	Mono																						
PAS	Neut	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	EO	w	w	w	w	w	+/-	+	w	w	w	w	w	w	w	w	+/-	-	w	+/-	+/-	w	
	Lym	w	w	w	+	+	+	w	w	w	-	w	w	w	w	+	+	w	w	+	+	+	
	Mono																						
ACP	Neut																						
	EO	w	w	w	+	w	w	w	w	w	+/-	+/-	+	-	w	+	w	w	-	-	+	w	
	Lym	w	+	+	w	w	w	+	+	w	+/-	+/-	w	+	+	+	w	+/-	+	+	+	w	
	Mono																						
PER	Neut	+	w	+	w	w	+	+	w	w	w	w	+	w	+	w	w	+	+	w	w	+	
	EO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Lym																						
	Mono																						
CAE	Neut	w	-	+/-	+/-	-	-	w	-	-	w	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	
	EO	w	+	+	+	+/-	+/-	-	w	w	+/-	+/-	-	+	-	+/-	+/-	-	w	w	w	-	
	Lym	w	+	+	+	+	w	w	w	w	-	+	-	+	-	w	w	-	w	w	+	-	
	Mono																						
αNAE	Neut																						
	EO	-	-	-	-	w	w	w	w	w	-	+/-	+/-	w	w	-	w	-	+/-	w	w	w	
	Lym	-	-	w	+	w	-	-	w	w	-	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	+	
	Mono	-	-	-	+	w	-	-	w	w	-	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	
βG	Neut																						
	EO																						
	Lym																						
	Mono	-	-	w	w	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	

SBB = Sudan Black B
Esterase
+ = Positive

CAE = Chloroacetate esterase
ACP=Acid Phosphatase
- = Negative

PAS = Periodic Acid Schiff
 β G = β Glucuronidase
W= Weak

α NAE= α -Naphthyl Acetate
PER = Peroxidase
+/- = Variable



تصویر شماره ۱: تاس ماهی ایرانی (قره برون) *Acipenser persicus*



تصویر شماره ۲: شیپ *Acipenser nudiventris*



تصویر شماره ۳: ازون برون *Acipenser stellatus*



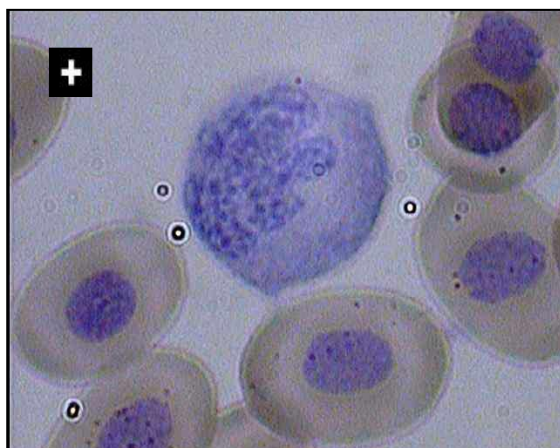
تصویر شماره ۴: تاس ماهی روسی (چالباش) *Acipenser gueldenstaedtii*



تصویر شماره ۵: فیل ماهی *Huso huso*



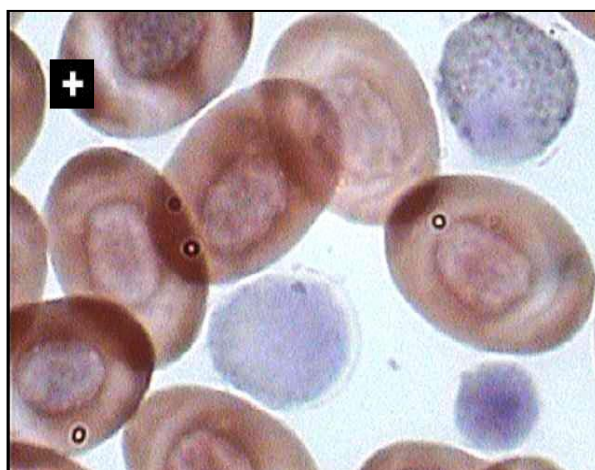
تصویر شماره ۶: روش خونگیری از ورید دمی شکمی تاس ماهیان



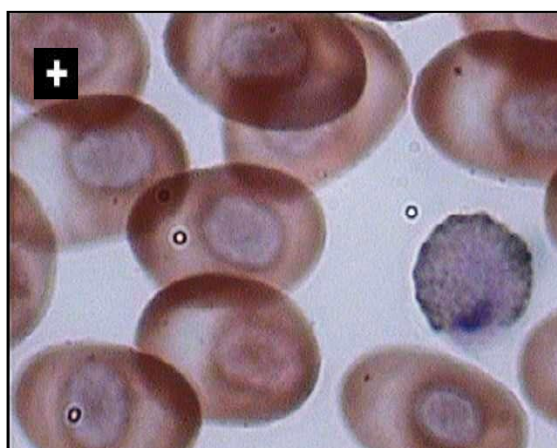
تصویر شماره ۷: واکنش مثبت نوتروفیل با سودان بلک بی



تصویر شماره ۸: واکنش ضعیف ائوزینوفیل با سودان بلک بی



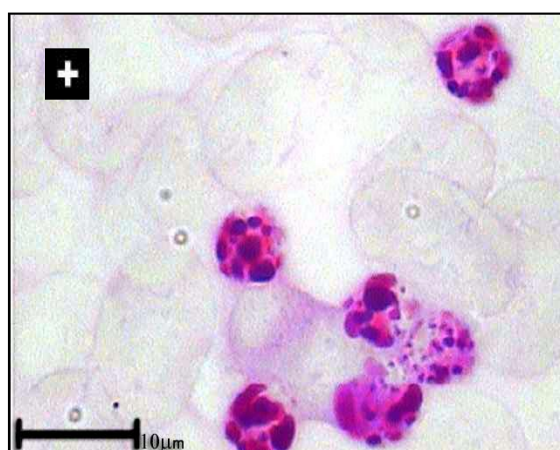
تصویر شماره ۹: واکنش مثبت نوتروفیل با پراکسیداز



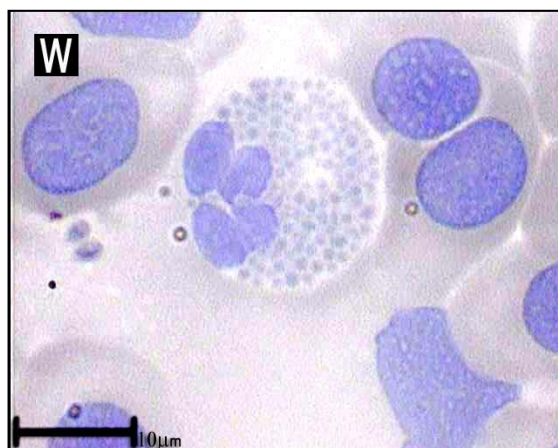
تصویر شماره ۱۰: واکنش مثبت ائوزینوفیل با پراکسیداز



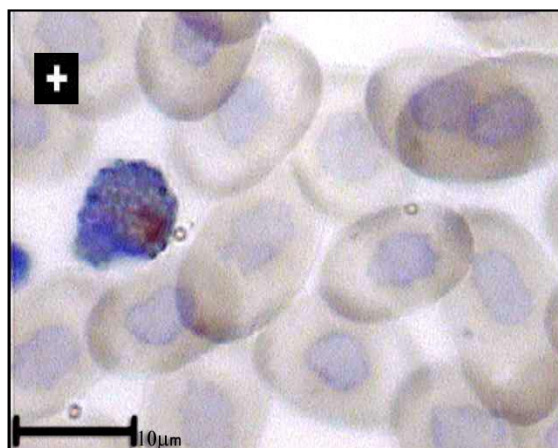
تصویر شماره ۱۱: واکنش مثبت نوتروفیل با پریودیک اسید شیف



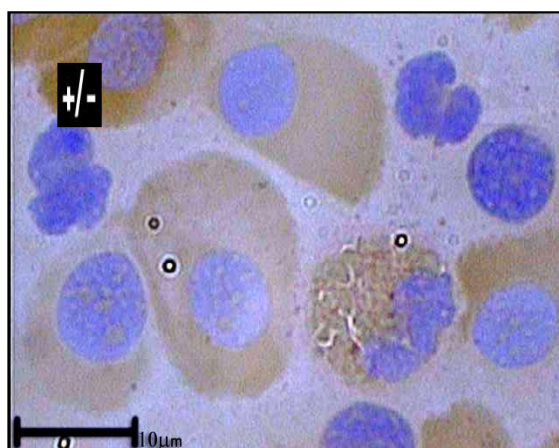
تصویر شماره ۱۲: واکنش مثبت لنفوسیت با پریودیک اسید شیف



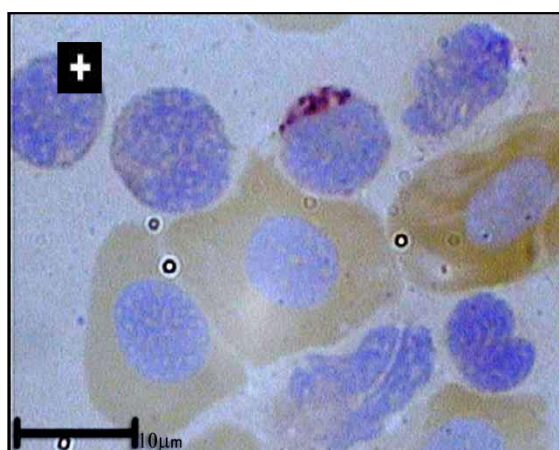
تصویر شماره ۱۳ : واکنش ضعیف اتوزینوفیل با اسید فسفاتاز



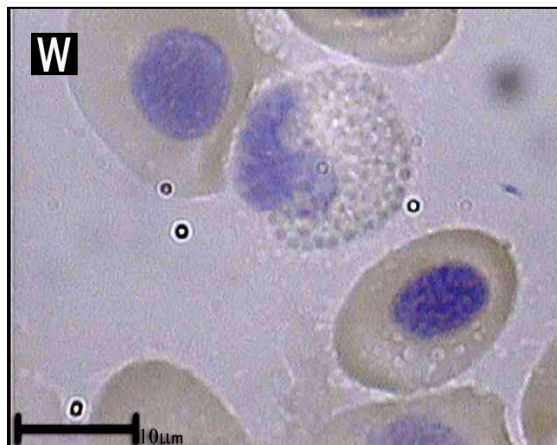
تصویر شماره ۱۴ : واکنش مثبت لنفوسیت با اسید فسفاتاز



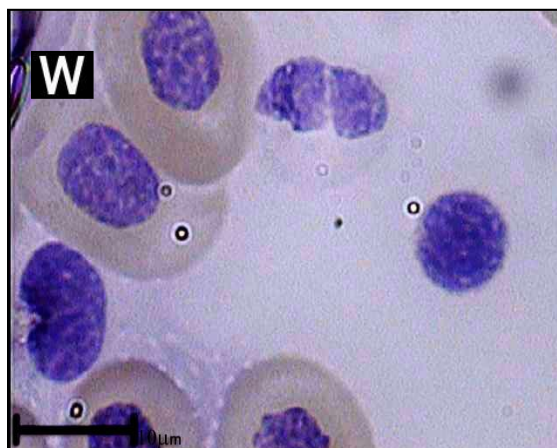
تصویر شماره ۱۵ : واکنش متغیر ائوزینوفیل با نفتول کلرواستات استراز



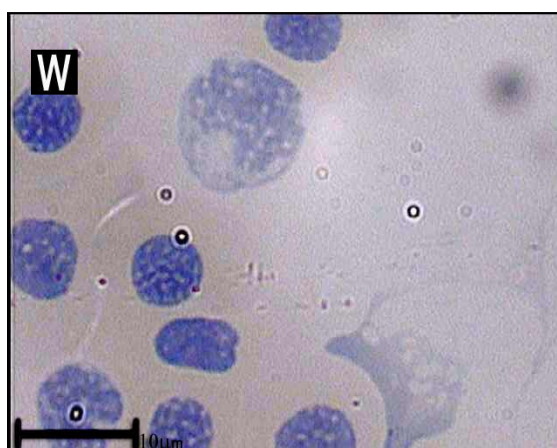
تصویر شماره ۱۶ : واکنش مثبت لنفوسیت با نفتول کلرواستات استراز



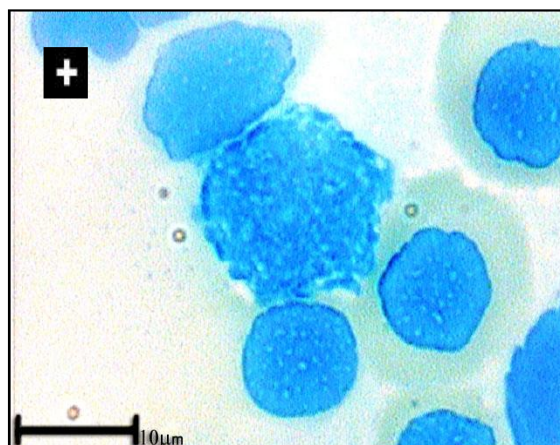
تصویر شماره ۱۷ : واکنش ضعیف ائوزینوفیل با نفتیل استات استراز



تصویر شماره ۱۸ : واکنش ضعیف لنفوسیت با نفتیل استات استراز



تصویر شماره ۱۹ : واکنش ضعیف مونوسیت با نفتیل استات استراز



تصویر شماره ۲۰: واکنش مثبت مونوسیت با β گلوکوروئیداز

	Ro	PER	SBB	PAS	ACP	CAE	α NAE	β G
Neu								
Eo								
Bas								
Lym								
Mon								

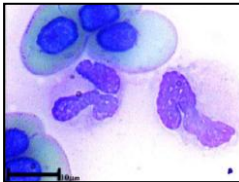
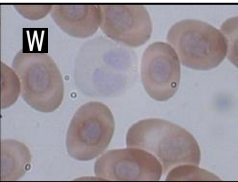
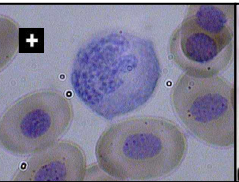
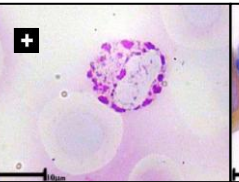
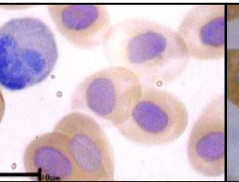

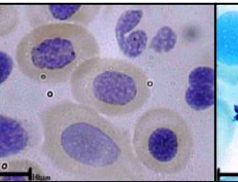
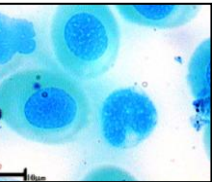
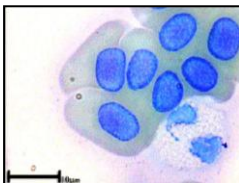
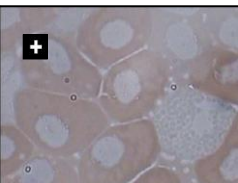


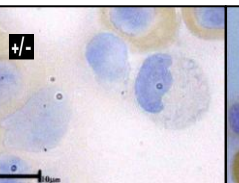
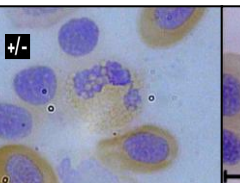
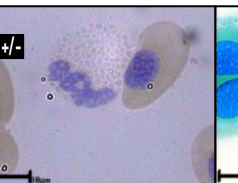
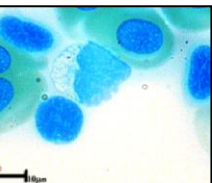








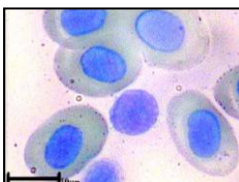
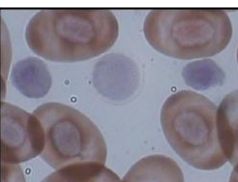

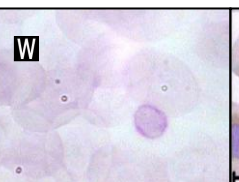
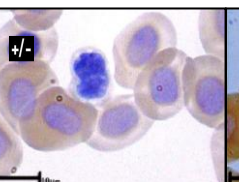
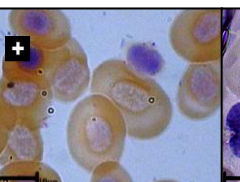
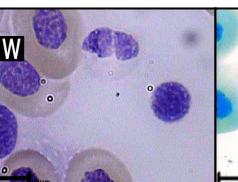
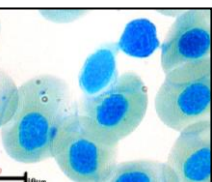
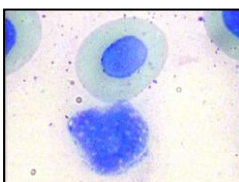
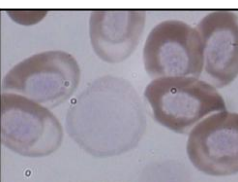
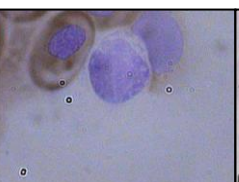
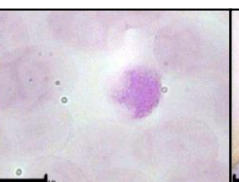
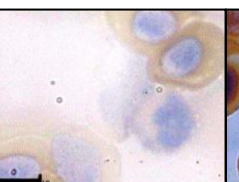
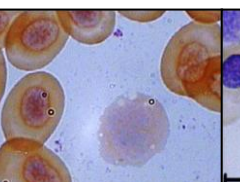
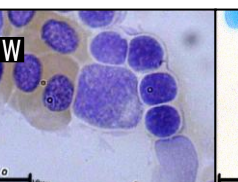
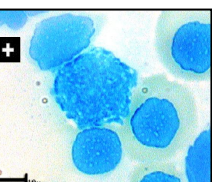
SBB = Sudan Black B CAE = Chloroacetate esterase PAS = Periodic Acid Schiff α NAE = α – Naphthyl Acetate Esterase
 ACP = Acid Phosphatase β G = β Glucoronidase PER = Peroxidase W = Weak +/- = Variable

	Ro	PER	SBB	PAS	ACP	CAE	α NAE	β G
Neu								
Eo								
Bas								
Lym								
Mon								

SBB = Sudan Black B CAE = Chloroacetate esterase PAS = Periodic Acid Schiff α NAE = α - Naphthyl Acetate Esterase
 ACP = Acid Phosphatase β G = β Glucuronidase PER = Peroxidase W = Weak +/- = Variable

	Ro	PER	SBB	PAS	ACP	CAE	α NAE	β G
Neu								
Eo								
Bas								
Lym								
Mon								

SBB = Sudan Black B CAE = Chloroacetate esterase PAS = Periodic Acid Schiff α NAE = α - Naphthyl Acetate Esterase
 ACP = Acid Phosphatase β G = β Glucuronidase PER = Peroxidase W = Weak +/- = Variable

	Ro	PER	SBB	PAS	ACP	CAE	α NAE	β G
Neu								
Eo								
Bas								
Lym								
Mon								

SBB = Sudan Black B CAE = Chloroacetate esterase PAS = Periodic Acid Shiff α NAE = α - Naphthyl Acetate Esterase
 ACP = Acid Phosphatase β G = β Glucoronidase PER = Peroxidase W = Weak +/- = Variable

تصویر ۲۵- یافته های سیتوشیمیایی گلبولهای سفید خون *Huso huso*

	Ro	PER	SBB	PAS	ACP	CAE	α NAE	β G
NØ								
EØ								
BØ								
Ly								
Mc								

SBB = Sudan Black B CAE = Chloroacetate esterase PAS = Periodic Acid Schiff α NAE = α - Naphthyl Acetate Esterase
 ACP = Acid Phosphatase β G = β Glucoronidase PER = Peroxidase W = Weak +/- = Variable

A study on cytochemical properties of white blood cells from *Acipenseridae* of southern Caspian Sea

The objective of this study was to study leukocytes characteristics of *Acipenseridae* of southern Caspian Sea stained by cytochemical stains in order to classify these cells more accurately. The samples were taken from Sturgeon propagation centers and International Sturgeon Research Institute in the north part of Iran. 10 fish were selected randomly from each age group (fingerling, 1, 2, 3 to 11 years) and blood samples were taken from caudal vein using syringes with no anticoagulant. Blood smears were prepared immediately and fixed by methanol. The smears then stained using cytochemical staining according to the Sigma-Aldrich instructions.

Neutrophils were positive for Sudan Black-B(SBB),Periodic acid-Schiff (PAS)and Peroxidase (PER) but negative for choloroacetate esterase (CAE). Eosinophils stained positively for PER and SBB and weakly for PAS, acid phosphatase (ACP), CAE and α - naphthyl acetate esterase (α - NAE). Basophil was absent in the studied blood smears. Lymphocytes were positive for ACP but weak for PAS, CAE and α - NAE. Monocytes stained positively for β - glucoronidase (β G) in *Acipenser persicus* 5 and 11 years group, in *Acipenser stellatus* 1 and 2 years group, in *Acipenser gueldenstaedtii* 1 year group, in *Acipenser nudiventris* 9 year and in *Huso huso* 7 year group and stained weakly for α - NAE.

Leila modiri